GE Healthcare

Biacore

Biacore A100

Ver. 1.1

Instrument Handbook

日本語取扱説明書

GE imagination at work

JJ-3031-01
(71-3197-31)

目次

1. Biacore A100 システムの概要 1

2. セットアップ 6

2-1. 電源およびソフトウェアの起動 6
2-1-1. 電源の立ち上げ 6
2-1-2. ランニング緩衝液ボトル、超純水のセット 6
補足 1 チューブの配置 7
補足 2 ランニング緩衝液の種類 7
2-1-3 コントロールソフトウェアの起動 8
2-2. システムの初期化 9
2-2-1. 温度設定 9
2-2-2. センサーチップの挿入 10
補足 3 センサーチップの種類 17
補足 4 サンプル、試薬の位置の表記 18
補足 5 ラックトレイ挿入時の注意事項 19
補足 6 ラックトレイ格納状況の確認 20
2-2-3. センサーチップの交換 21
2-3. データ保存用フォルダの作成 22

3. 固定化 23

3-1. リガンドの必要固定化量 25
3-2. リガンド希釈液の pH 選択 26
3-2-1. リガンド希釈液の pH 選択の実行 27
3-2-2. pH 選択の結果評価 32
3-3. 固定化操作 34
3-3-1. 固定化の実行 36
3-3-1-1. 1 つのスポットへの固定化方法 38
3-3-1-2. 2 つのスポットへの同時固定化方法 39
3-3-2. 固定化量の確認 40
3-3-3. センサーチップの固定化状況の確認 40
補足 7 キャプチャー法のための固定化 41
補足 8 オリジナル固定化メソッドの作成 42

4. 相互作用測定のための条件検討 46

4-1. コントロールサンプルを用いた結合の確認 47
4-1-1. 結合確認測定の実行 47
4-1-2. 結合の有無の評価 52
4-2. 再生条件の検討 55
補足 9 再生溶液の例 56
4-2-1. 再生条件検討の実行 57
4-2-2. 再生条件の評価 63
4-3. リガンドの耐久性試験 66
4-3-1. 繰り返し測定の実行 66
4-3-2. 繰り返し測定の結果の評価 71
4-4. 測定の中止 73

5. 測定プログラムの説明 74

5-1. メソッドの作成 75
5-2. サンプル位置の設定と変更 100

6. 目的別測定法 102

6-1. スクリーニング 102
6-2. 反応速度定数・解離定数の算出 115
6-3. 低分子化合物アナライトを測定する際の注意事項 124
6-3-1 溶媒補正用 DMSO 溶液の確認 128
6-3-2 溶媒補正ステップの設定 132

7. メンテナンス 134

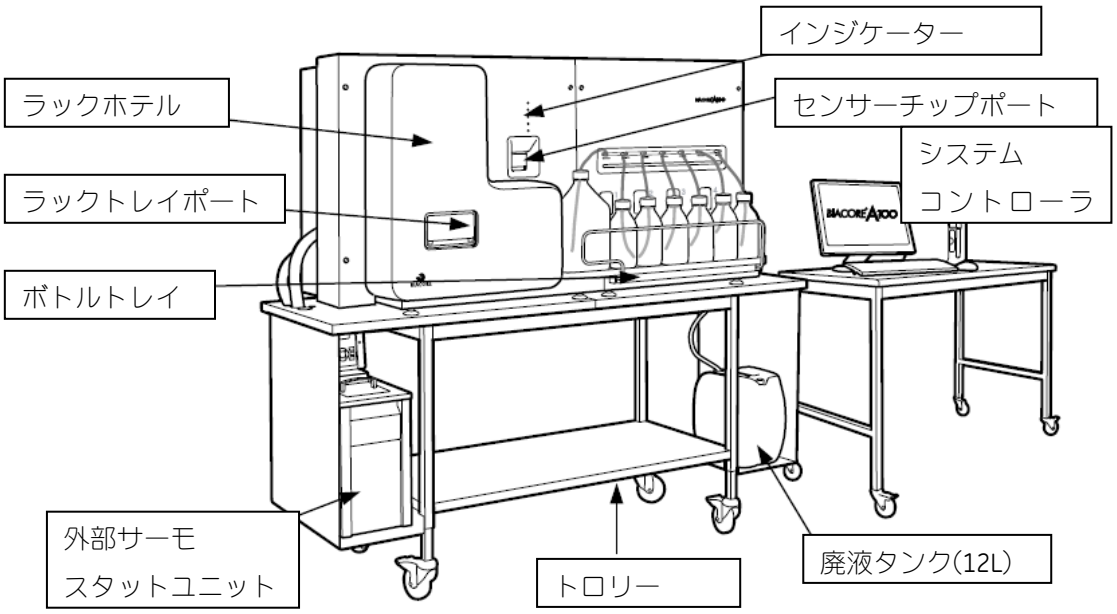
7-1. 日常のメンテナンス 136
7-1-1. Desorb 136
7-1-2. Desorb and Sanitize 139
7-1-3. Superclean 143
補足 10 メンテナンス実施例 145
7-2. フローシステムの洗浄 146
7-2-1. Change Buffers 1- 4 146
7-2-2. Change Reagent A 146
7-2-3. Flow System Wash 146
7-2-4. Startup 147

7-3. 検出器の調整 148
7-3-1. Normalize 148
7-3-2. Hydrodynamic Addressing 150
7-3-3. Spot Configuration 153
7-4. システムチェック 155
8. 測定の終了 158
8-1. Standby Flow 状態での放置 158
8-2. Shutdown の実行 159
9. データ解析 162
9-1. データの抽出 163
補足１１ レポートポイントの位置 170
補足 12 レポートポイントの追加 171
補足１３ サンプル名、濃度等の再入力 173
補足 14 データ補正 174
補足１５ データチェック（Quality Control） 179
補足 16 レポートポイントデータの編集 185
9-2. 目的別データ解析方法 186
9-2-1. スクリーニング 186
補足 17 新規プロットの作成 189
補足 18 センサーグラムの重ね書き 194
9-2-2. 反応速度定数・解離定数 199
9-2-2-1. 反応速度定数・解離定数の算出 201
補足 19 解析モードの変更 215
補足 20 再解析 217
補足 21 解析結果の自動評価機能 219
補足 22 解析データの保存と保存形式 222
補足 23 センサーグラムの取り込みとテキストデータでの保存 223
10. 付属英語マニュアルの紹介 224

目次

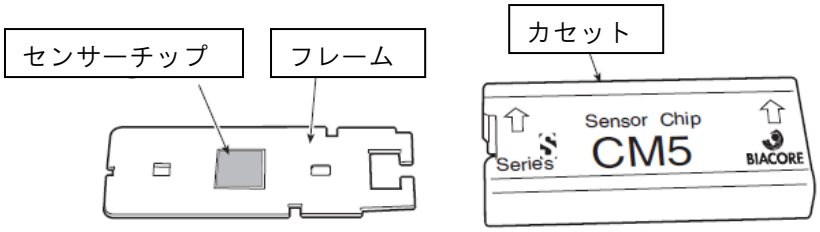
1. Biacore A100 システムの概要

システムは本体とそれを制御するシステムコントローラー、試薬・サンプル保管庫（ラックホテル）内の温度を制御する外部サーモスタットユニットから構成されている。



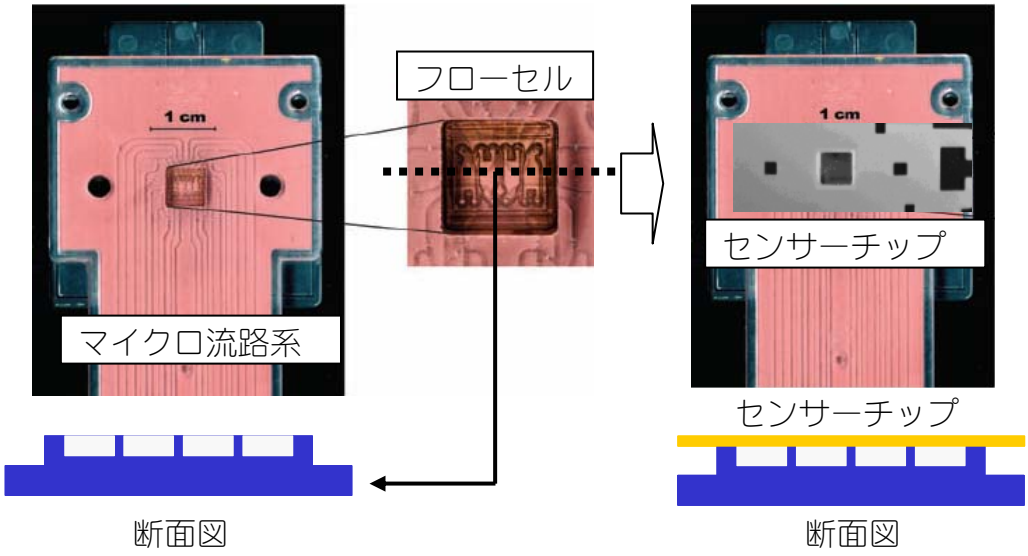
Biacore システムによる分子間相互作用測定は、フローインジェクション分析を基本にしており、ランニング緩衝液と呼ばれる移動相に試薬・サンプルを添加することで行う。

●センサーチップ
相互作用の反応場である。測定したい 2 分子のうち片方の分子を固定化する。ガラス基板に金をコーティングしたもので、保護用のカセットに収められている。

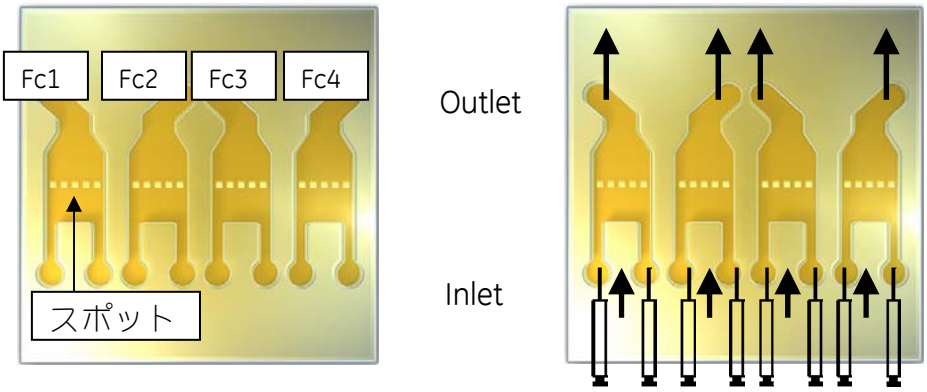


●マイクロ流路系

マイクロ流路系は微細な流路が形成されたカートリッジである。シリンジポンプによりランニング緩衝液、試薬、サンプルが送液される。流路は Y 字型で上部が開放されたフローセル(Fc)と呼ばれる部分につながっている。フローセルは 4 つあり個別に使用する。



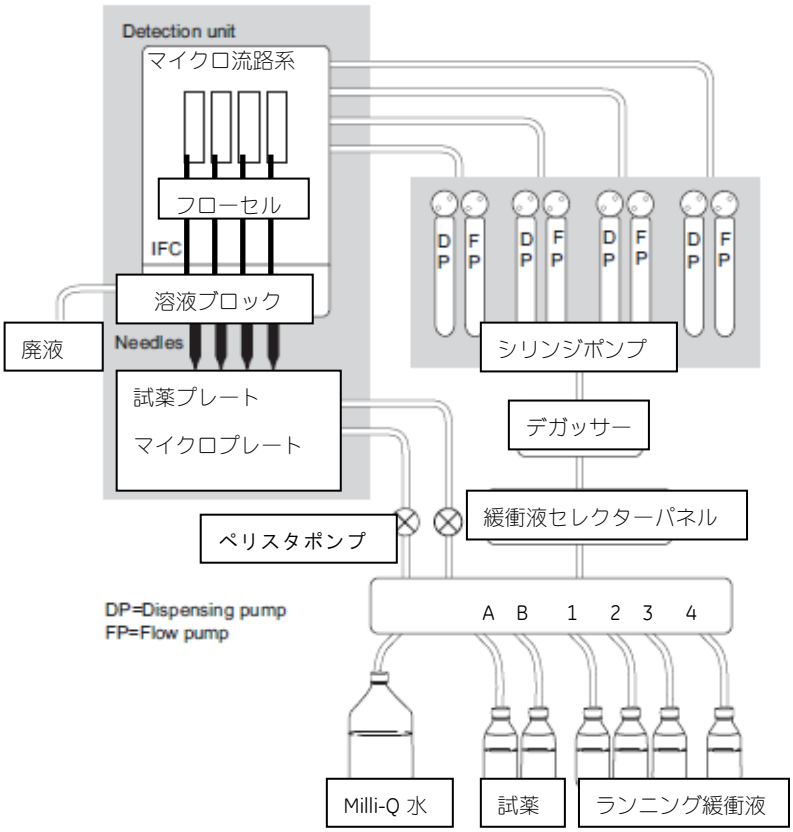
測定時はセンサーチップでフローセルを密閉し、反応場を形成する。
形成された 1 フローセルあたりセンサーチップ表面上に 5 つの測定スポットが形成される。4 フローセルで計 20 スポットの測定が可能である。



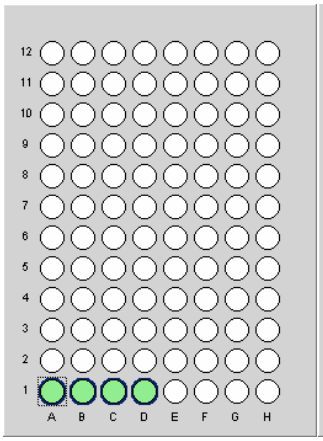
各フローセルはそれぞれ 2 本のシリンジポンプに接続している。1 本はランニング緩衝液を一定流速で流すためのものであり、他方はサンプル・試薬添加用のオートサンプラーニードルにつながっている。

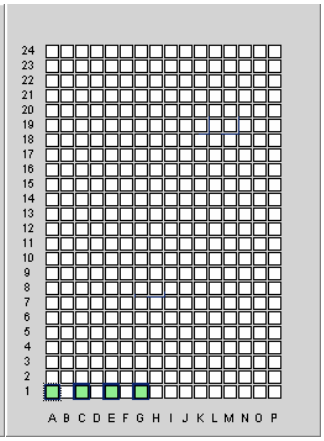
●フローシステム

溶液は目的に応じて所定の位置に送液される。各チューブから吸引されたランニング緩衝液(1～4)は、緩衝液セレクターパネル、デガッサーを通過し、シリンジポンプ（DP、FP）に供給され、そこから定流速でフローセルに供給される。超純水､試薬 A はペリスタルティックポンプにより溶液ブロックに供給される。固定化の際には B を固定化用緩衝液にセットする。



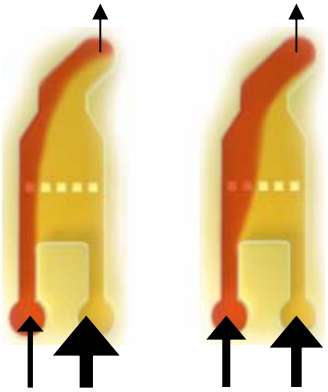
オートサンプラーニードルは 4 つのフローセルに対応するために 4 本ある。
各ニードルは等間隔で配置されている。
この間隔は 96 ウェル、384 ウェルプレート上で下記のようになる。





オートサンプラーニードルは等間隔で固定されており、4 本同時に同じ動きをする。使用するフローセルが 1 つであっても測定中は他のニードルも同じ動作をするため、ダミーの試薬・サンプルおよびランニング緩衝液を準備する必要がある。

各フローセルのスポット間に物理的な隔壁は存在しない。
したがって固定化の際には 2 つのインレットからの流速を制御することにより目的のスポット上に送液し、固定化する。
（ハイドロダイナミックアドレッシング方式）。



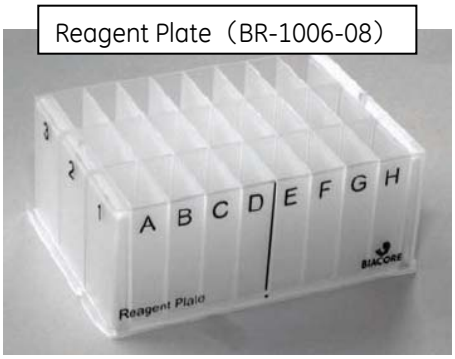
（固定化時）

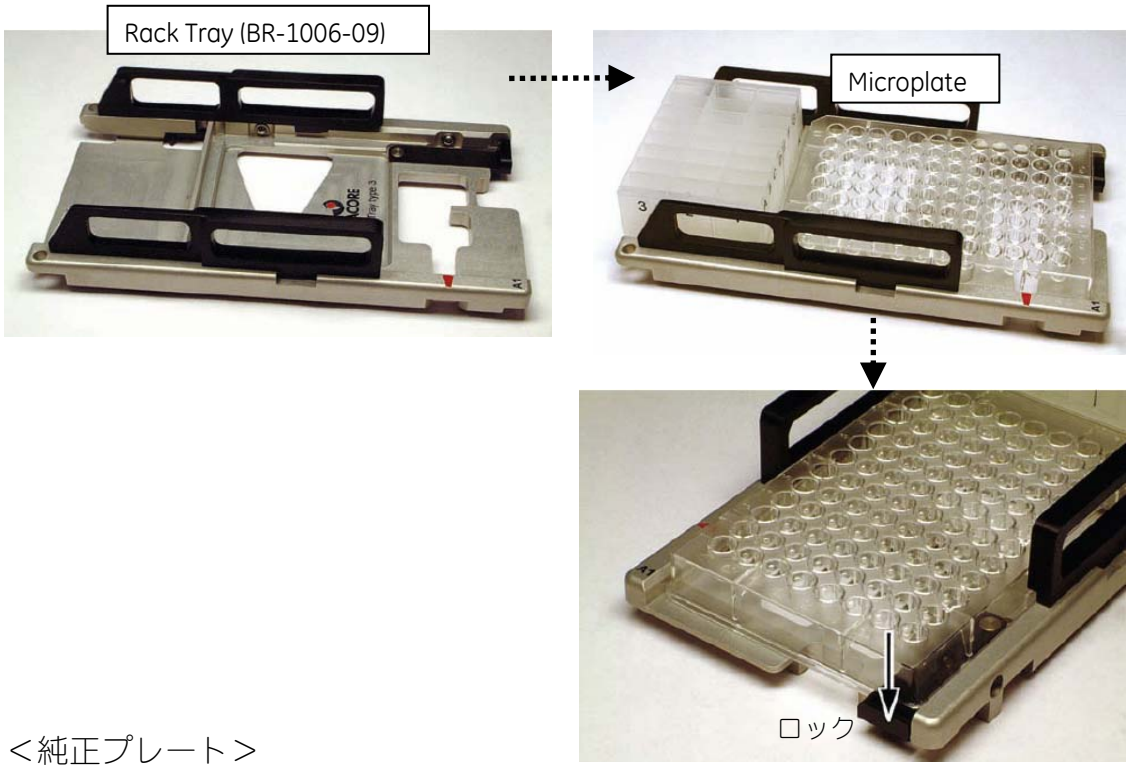
相互作用測定時は全スポット上をサンプルが流れる。
サンプルは片方のインレットから供給される。

（相互作用測定時）

●サンプル、試薬プレート

サンプル、試薬はマイクロプレートもしくは試薬プレートに入れ、ラックトレイにセットする。





＜純正プレート＞

- Reagent Plate and Foil　24 穴ディスポーザブル試薬プレートとプラスチック製透明粘着フォイル　(BR-1006-08)
- Microplate 96-well　ポリスチレン製 96 穴マイクロプレート (BR-1005-03)
- Microplate Foil (96-well)　プラスチック製透明粘着フォイル 96 穴 (BR-1005-78)
- Microplate 384-well　ポリスチレン製 384 穴マイクロプレート (BR-1005-05)
- Microplate Foil (384-well)　プラスチック製透明粘着フォイル 384 穴 (BR-1005-77)

2. セットアップ

2-1. 電源およびソフトウェアの起動

2-1-1. 電源の立ち上げ

定電圧電源装置→テーブルタップの電源□プリンター → モニター画面 → システム本体 → 外部サーモスタットユニット(2 箇所)→コンピューター の順番に電源を入れる。
コンピューター起動時にログインパスワード"biacore"を入力する。

装置本体の電源を入れると、本体のフロント左上にあるすべてのインジケーター（LED ランプ）が数秒間点灯し、リセットされて消える。その後 **ready** のインジケーターが点灯し、**temperature** のインジケーターは点滅する。

2-1-2. ランニング緩衝液ボトル、超純水のセット

ボトルトレイにランニング緩衝液、超純水、試薬ボトル等をセットする。
"1"～"4"のチューブはランニング緩衝液、"Water"、"A"、"B"のチューブには超純水をセットする。なお測定段階ごとにセットするボトルの内容は変化する。

補足 1　チューブの配置

チューブ	溶液	供給先
Water	超純水	溶液ブロック
A	試薬・再生溶液等	溶液ブロック
B	固定化緩衝液	シリンジポンプ/溶液ブロック
1	ランニング緩衝液（フローセル 1 用）	シリンジポンプ/溶液ブロック
2	ランニング緩衝液（フローセル 2 用）	シリンジポンプ/溶液ブロック
3	ランニング緩衝液（フローセル 3 用）	シリンジポンプ/溶液ブロック
4	ランニング緩衝液（フローセル 4 用）	シリンジポンプ/溶液ブロック

補足 2　ランニング緩衝液の種類

Biacore A100 システム用ランニング緩衝液（x10 conc.）を販売している。

●**HBS-EP+ 10X** バッファー　（1000 ml, BR-1006-69）
0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 30 mM EDTA, 0.5 % v/v Surfactant P 20
⇒超純水で 10 倍希釈
0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0.05 % Surfactant P 20, pH 7.4

●**HBS-P+ 10X** バッファー　（1000 ml, BR-1006-71）
0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl, 0.5 % v/v Surfactant P 20
⇒超純水で 10 倍希釈
0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, 0.05 % Surfactant P 20, pH 7.4

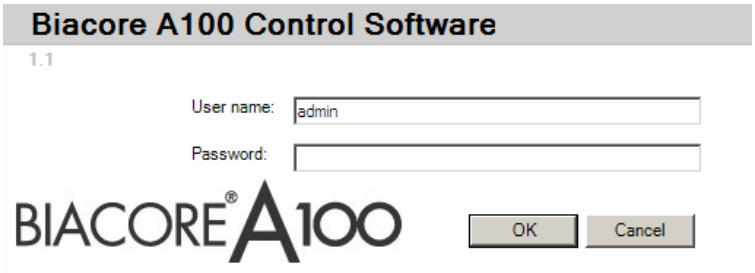
●**HBS-N+ 10X** バッファー　（1000 ml, BR-1006-70）
0.1 M HEPES, 1.5 M NaCl
⇒超純水で 10 倍希釈
0.01 M HEPES, 0.15 M NaCl, pH 7.4

●**PBS 10X** バッファー　（1000 ml, BR-1006-72）
0.1 M phosphate buffer, 27 mM KCl, 1.37 M NaCl
⇒超純水で 10 倍希釈
0.01 M phosphate buffer, 2.7 mM KCl, 0.137 M NaCl
DMSO を 5%(v/v)となるように加えると pH 7.4 になる。

実験目的にあわせ緩衝液の変更は可能であるが、各自で調製する場合には、0.22 um フィルターでろ過を行う。

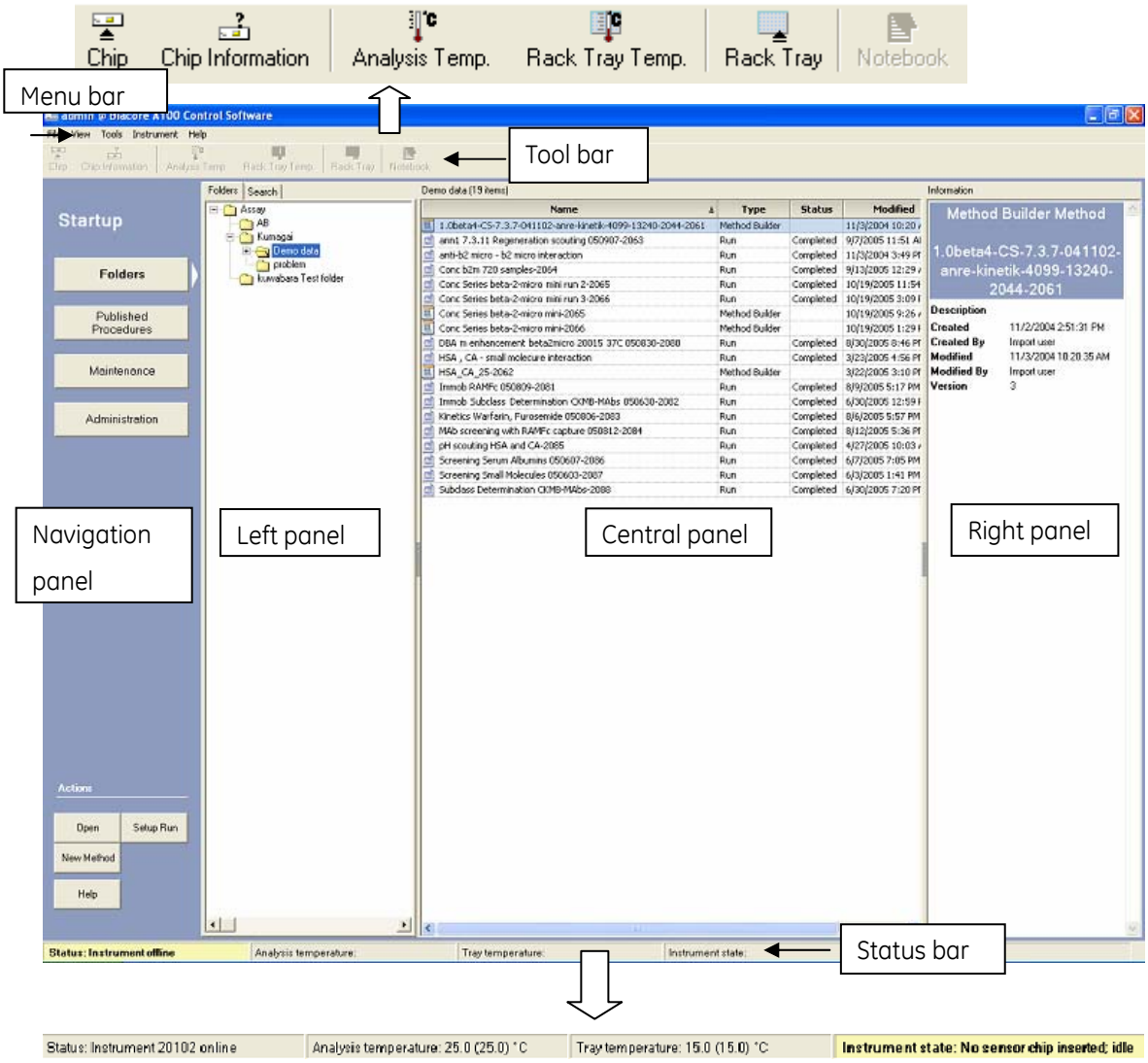
2-1-3　コントロールソフトウェアの起動

初期画面中の左下の **Start** から、**BIA programs** →**Biacore A100 Control Software** のアイコンをクリックする。



↓

User name:と **Password:**を入力し、**OK** をクリックする。

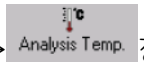


装置と PC の接続状況　　測定温度　　ラックホテル内温度

2-2.　システムの初期化

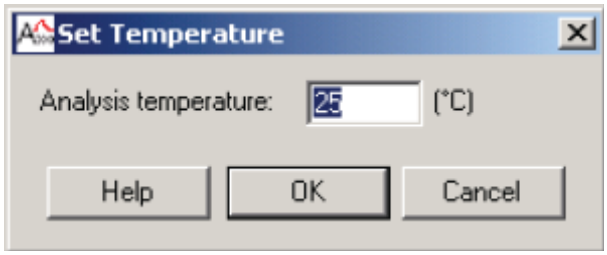
2-2-1.　温度設定

＜検出ユニット＞
フローセルを含む検出器部位の温度設定を行う。

Toolbar→ 

をクリックする。

↓



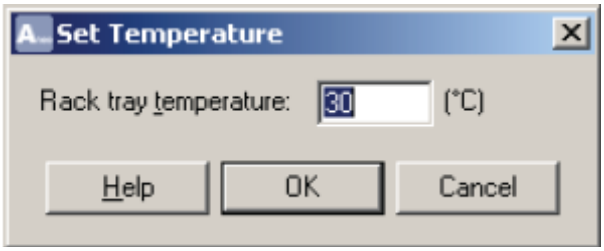
4～40℃の範囲で設定し、**OK** をクリックする。

＜ラックホテル＞
ラックホテル内の温度設定を行う。

Toolbar→

をクリックする。

↓



4～40℃の範囲で設定し、**OK** をクリックする。

サンプルの性状により設定温度を決定する。
低分子化合物のみをセットする場合には、溶解性の低いものは低温で析出する可能性があるため、25℃以上にセットすることをお奨めする。

2-2-2. センサーチップの挿入

Toolbar→

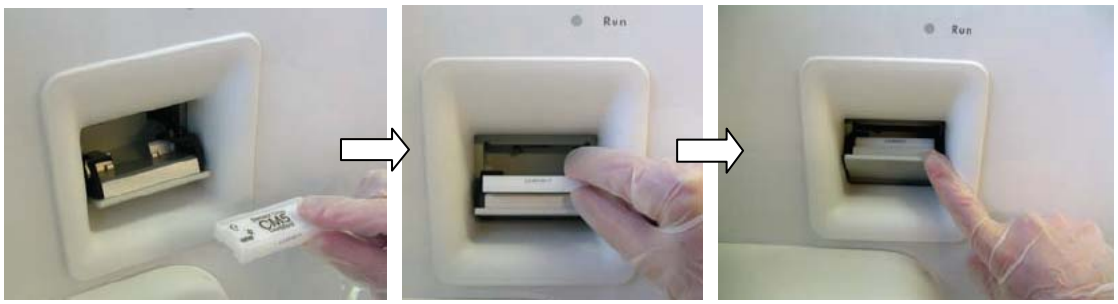
をクリックする。

↓

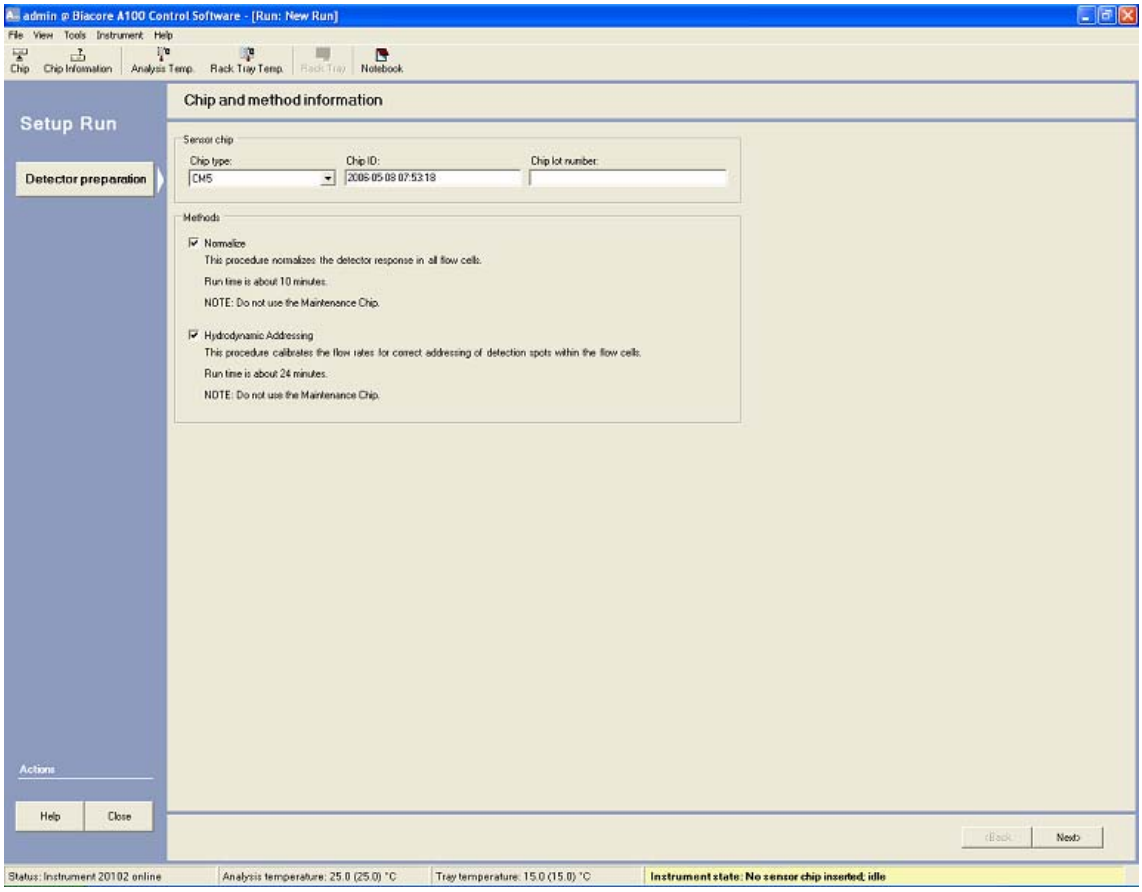
センサーチップポートが自動的に開く。

↓

センサーチップの印字面を上にして挿入し、カバーを閉める。



↓



（Sensor chip）

Chip type:　：使用するセンサーチップの種類を選択する。

Chip ID:　：その時点での日付、時刻が自動的に入力されている。必要に応じて変更する。

Chip lot number:　：センサーチップのロット番号を入力する。

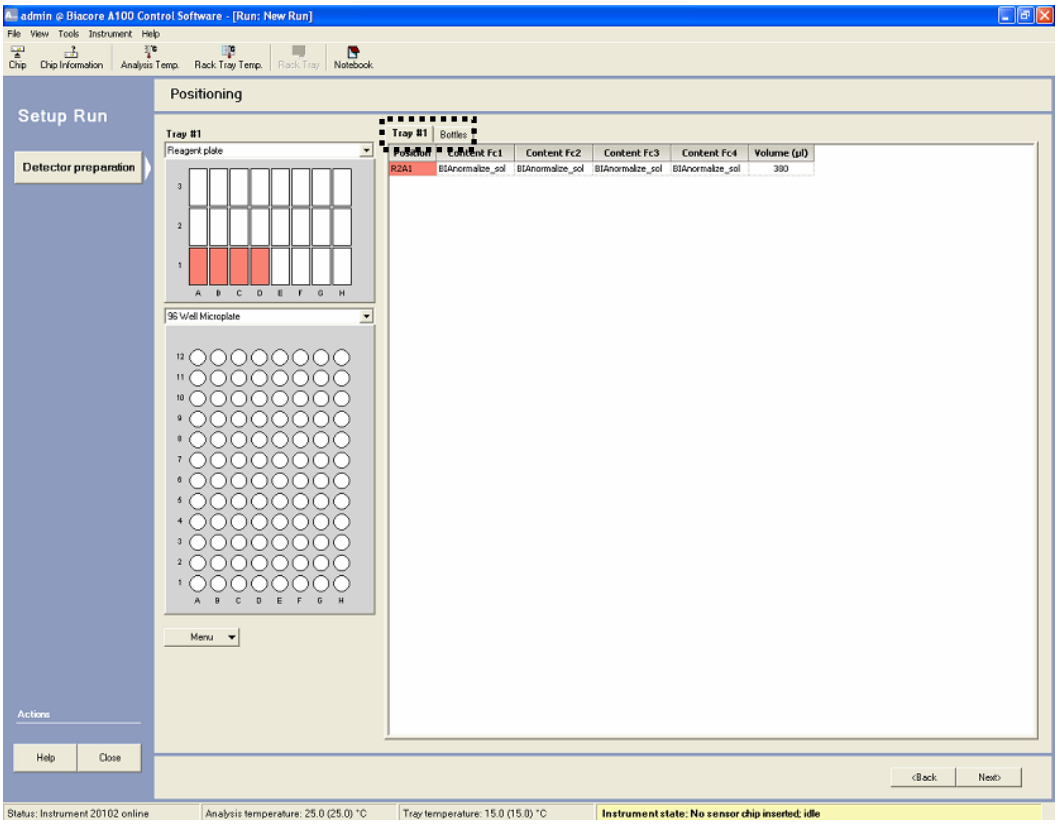
（Methods）

Normalize　：検出器の受光感度の補正を行う操作。所要時間約 10 分間。

Hydrodynamic Addressing　：スポットごとの流れを調整する操作。Normalize とあわせ実施する。所要時間約 20 分間。

Normalize と **Hydrodynamic Addressing** にチェックが入っていることを確認し **Next >**をクリックする。

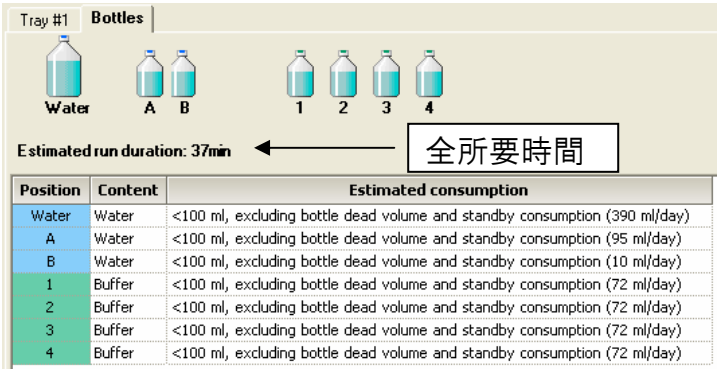
↓


admin @ Biacore A100 Control Software - [Run: New Run]
File View Tools Instrument Help
Chip Chip Information Analysis Temp. Rack Tray Temp. Rack Tray Notebook
Setup Run
Detector preparation
Positioning
Tray #1
Reagent plate
Tray #1 Bottles
Position Content Fc1 Content Fc2 Content Fc3 Content Fc4 Volume (µl)
R2A1 BIAnormalize_sol BIAnormalize_sol BIAnormalize_sol BIAnormalize_sol 380
96 Well Microplate
Menu
Actions
Help Close
<Back Next>
Status: Instrument 20102 online
Analysis temperature: 25.0 (25.0) °C
Tray temperature: 15.0 (15.0) °C
Instrument state: No sensor chip inserted; idle

BIAnormalizing solution(BIAmaintenance Kit 中)を 380µl ずつ試薬プレートの指定場所に分注し、ラックトレイにセットする。
（サンプル、試薬の位置に関しては 18 ページの補足 4 参照のこと）

↓

Bottles タブをクリックしボトル内容量を確認する。

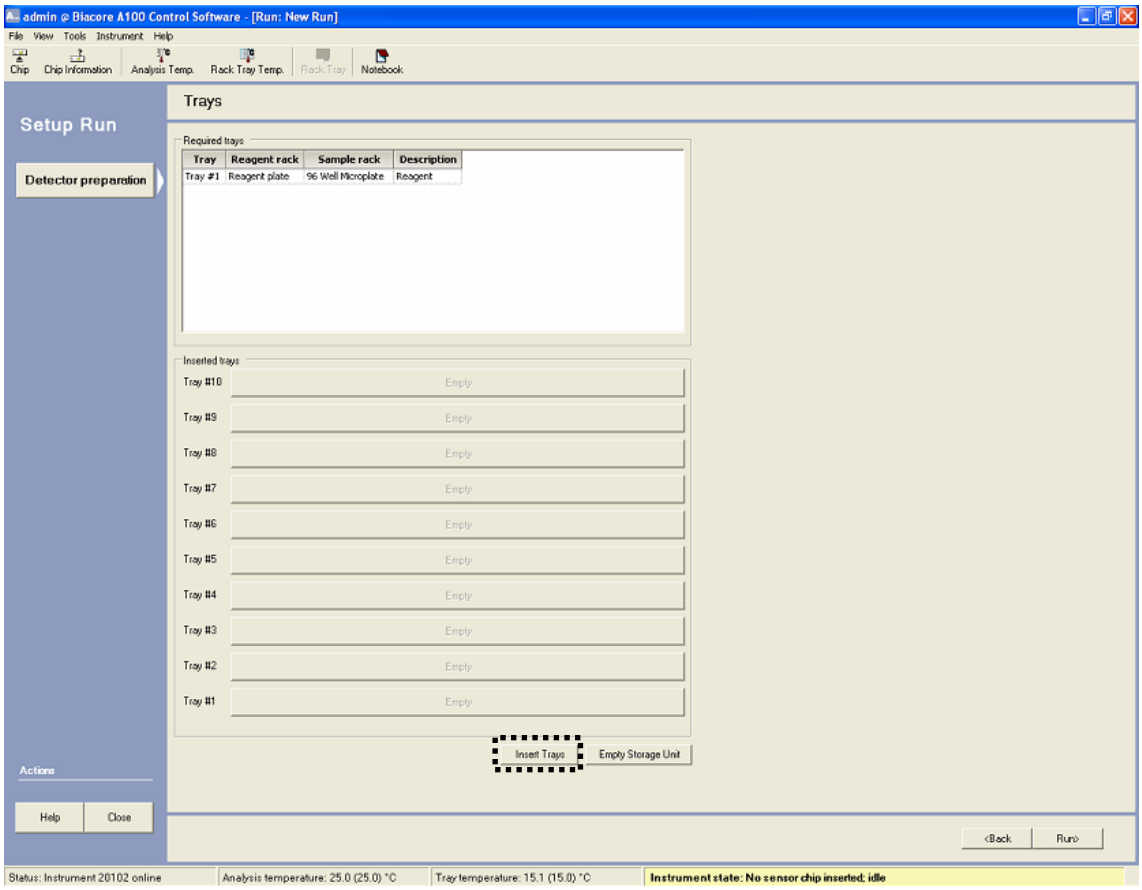


Position	Content	Estimated consumption
Water	Water	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (390 ml/day)
A	Water	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (95 ml/day)
B	Water	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (10 ml/day)
1	Buffer	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)
2	Buffer	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)
3	Buffer	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)
4	Buffer	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)

↓

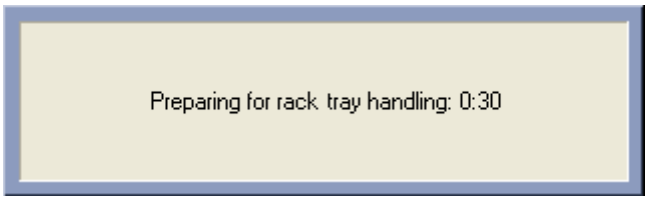
Next >をクリックする。

↓



Insert Trays をクリックする。

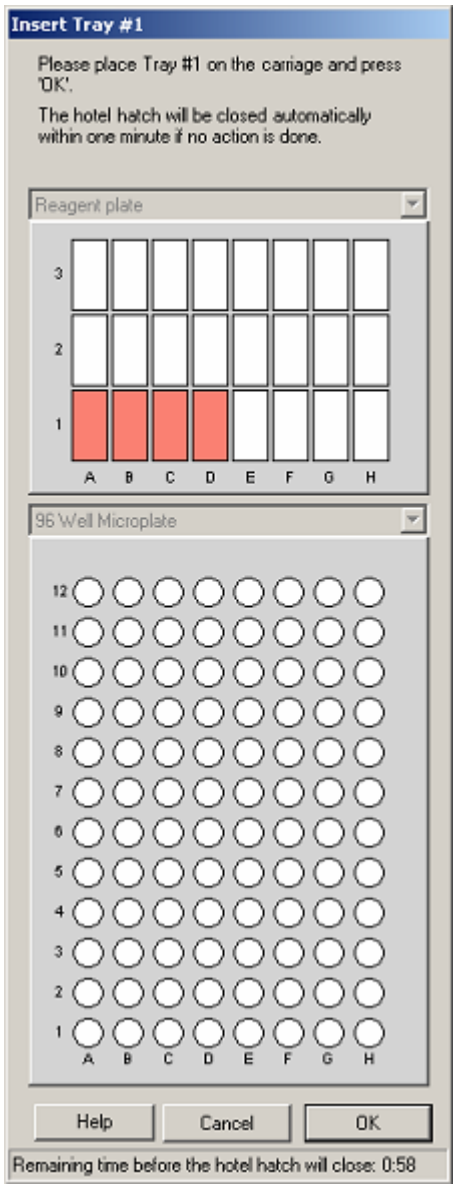
↓



ラックトレイポートが開く。

↓

Insert Tray ダイアログが表示される。

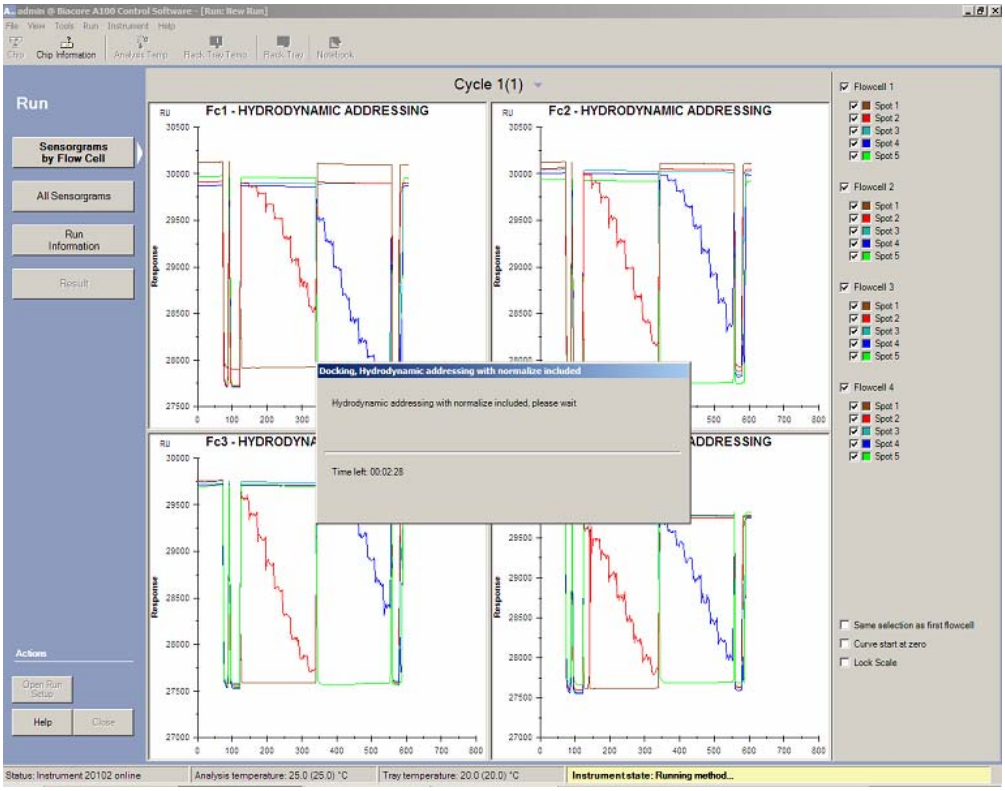


ラックトレイポートは 60 秒で自動的に閉まる。
ラックトレイをラックトレイポートに置き、**OK** をクリックする。
（ラックトレイ挿入時の注意事項は 19 ページの補足 5 参照のこと）

↓

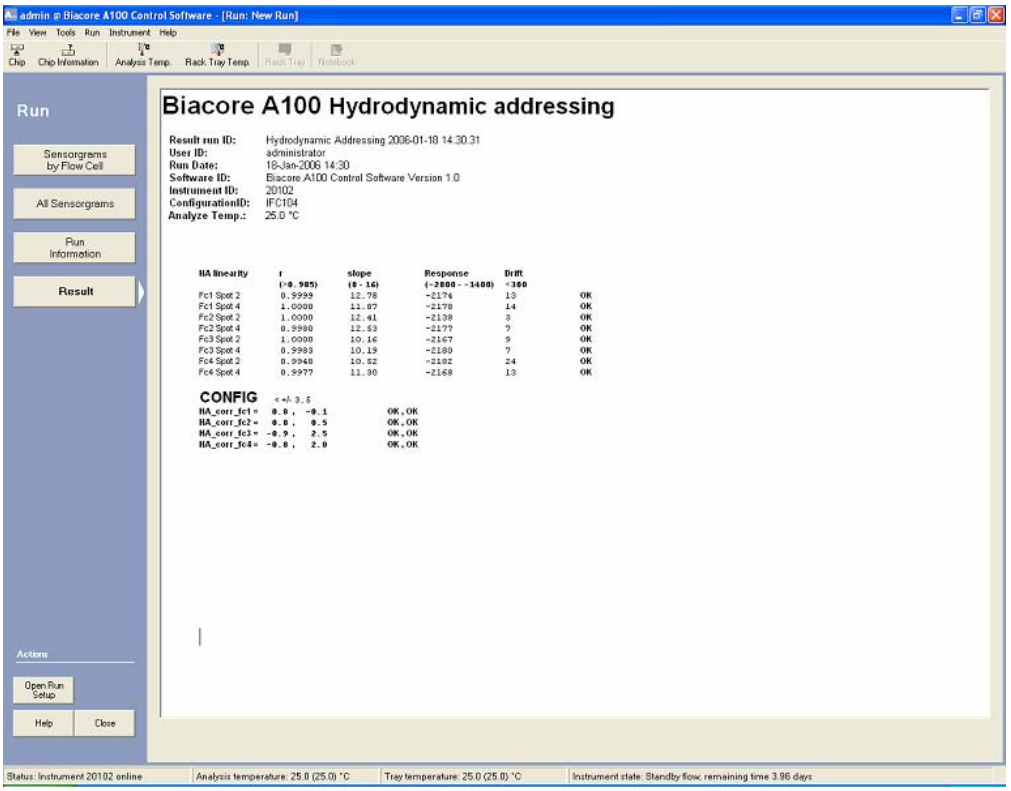
Run >をクリックする。

↓


admin @ Biacore A100 Control Software - [Run: New Run]
Run
Sensorgrams by Flow Cell
All Sensorgrams
Run Information
Result
Actions
Open Run Setup
Help
Close
Cycle 1(1)
Fc1 - HYDRODYNAMIC ADDRESSING
Fc2 - HYDRODYNAMIC ADDRESSING
Docking, Hydrodynamic addressing with normalize included
Hydrodynamic addressing with normalize included, please wait
Time left: 00:02:28
Flowcell 1
Flowcell 2
Flowcell 3
Flowcell 4
Spot 1
Spot 2
Spot 3
Spot 4
Spot 5
Same selection as first flowcell
Curve start at zero
Lock Scale
Status: Instrument 20102 online
Analysis temperature: 25.0 (25.0) °C
Tray temperature: 20.0 (20.0) °C
Instrument state: Running method...

↓

実行結果が表示される。


admin @ Biacore A100 Control Software - [Run: New Run]
Run
Sensorgrams by Flow Cell
All Sensorgrams
Run Information
Result
Actions
Open Run Setup
Help
Close
Biacore A100 Hydrodynamic addressing
Result run ID: Hydrodynamic Addressing 2006-01-18 14:30:31
User ID: administrator
Run Date: 18-Jan-2006 14:30
Software ID: Biacore A100 Control Software Version 1.0
Instrument ID: 20102
ConfigurationID: IFC104
Analyze Temp.: 25.0 °C
HA linearity
r (>0.985)
slope (8 - 16)
Response (-2800 - -1400)
Drift <300
Fc1 Spot 2 0.9999 12.78 -2176 13 OK
Fc1 Spot 4 1.0000 11.87 -2178 14 OK
Fc2 Spot 2 1.0000 12.41 -2138 8 OK
Fc2 Spot 4 0.9980 12.53 -2177 7 OK
Fc3 Spot 2 1.0000 10.16 -2167 9 OK
Fc3 Spot 4 0.9983 10.19 -2180 7 OK
Fc4 Spot 2 0.9948 10.52 -2182 24 OK
Fc4 Spot 4 0.9977 11.90 -2168 13 OK
CONFIG
HA_corr_fc1 = 0.8 , -0.1 OK,OK
HA_corr_fc2 = 0.8 , 0.5 OK,OK
HA_corr_fc3 = -0.9 , 2.5 OK,OK
HA_corr_fc4 = -0.8 , 2.0 OK,OK
Status: Instrument 20102 online
Analysis temperature: 25.0 (25.0) °C
Tray temperature: 25.0 (25.0) °C
Instrument state: Standby flow, remaining time 3.86 days

↓

基準値内であれば **OK**、外れた場合には **Bad** が表示される。

＜Bad が表示された場合＞

Change buffer 1- 4 を実行する。（146 ページ参照）

↓

Hydrodynamic Addressing を再度実行する。（150 ページ参照）

↓

再度 **Bad** が表示された場合には **Spot Configuration**（153 ページ参照）を実行後に再度 **Hydrodynamic Addressing** を実行する。

補足 3　センサーチップの種類

各センサーチップの詳細は弊社総合カタログ等を参照のこと。

1. カルボキシル基タイプ（タンパク質、ペプチド、化合物などの固定化）

Series S Sensor Chip CM5	3 枚	BR-1006-68
Series S Sensor Chip CM5 (certified)	3 枚	BR-1005-30
Series S Sensor Chip CM4 (certified)	3 枚	BR-1005-34
Series S Sensor Chip CM3 (certified)	3 枚	BR-1005-36
Series S Sensor Chip C1 (certified)	3 枚	BR-1005-35

2. ストレプトアビジンタイプ（ビオチン標識の DNA やペプチドなどの固定化）

Series S Sensor Chip SA (certified)	3 枚	BR-1005-31

3. 疎水基タイプ（リン脂質、糖脂質、膜タンパク質などの固定化）

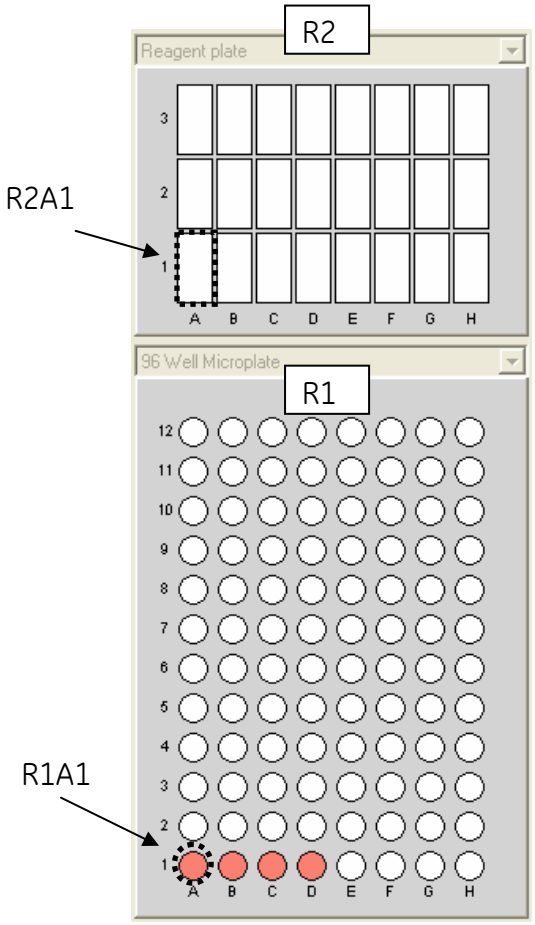
Series S Sensor Chip HPA (certified)	3 枚	BR-1005-33
Series S Sensor Chip L1 (certified)	3 枚	BR-1005-38

4. 金属キレートタイプ（His-tag タンパク質の固定化）

Series S Sensor Chip NTA (certified)	3 枚	BR-1005-32

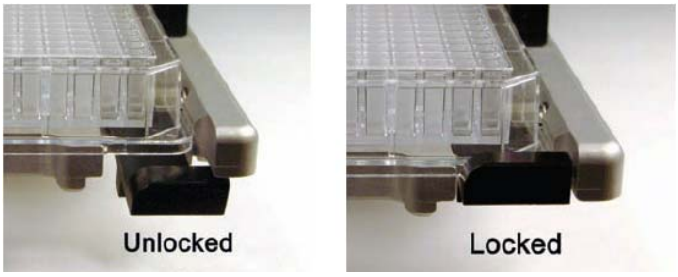
補足 4　サンプル、試薬の位置の表記

96 ウェルもしくは 384 ウェルマイクロプレートをセットする位置をラック 1（R1)、試薬プレートをセットする位置をラック 2（R2）とする。
試薬プレートは前面に A～H のアルファベットが、左側面に 1～3 の印字があるのでアルファベット・数字の順で位置を表記する。
マイクロプレートの場合も同様にプレート表面に刻印されているアルファベット・数字の順で表記する。



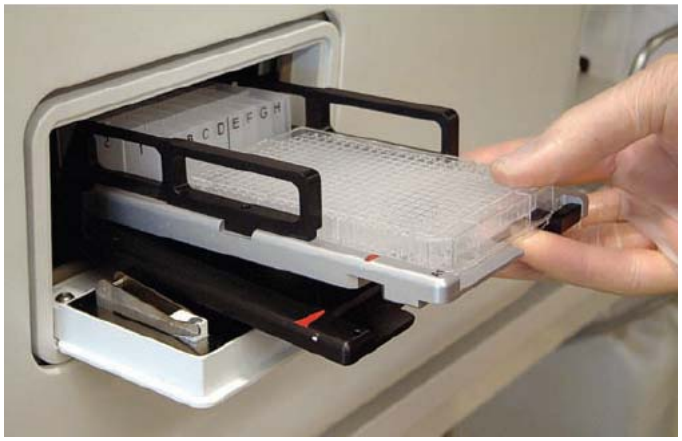
補足 5　ラックトレイ挿入時の注意事項

ラックトレイのロックを確認する。



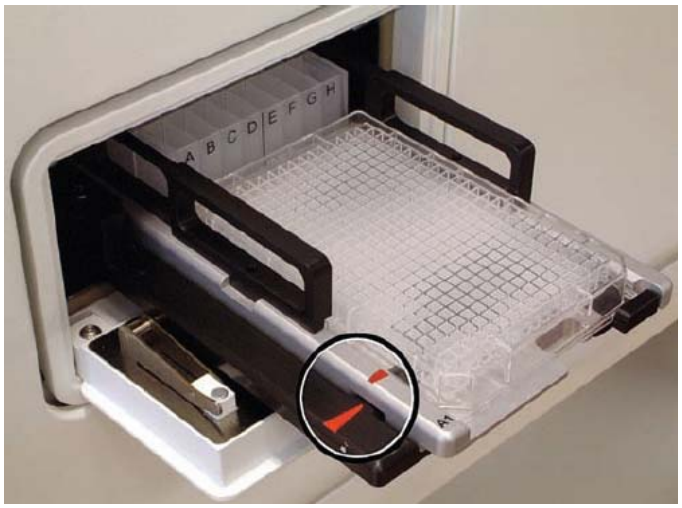
マイクロプレートをセットしない場合も必ずロックする。

↓



ラックトレイポートからキャリアーが出てきたらラックトレイをセットする。

↓



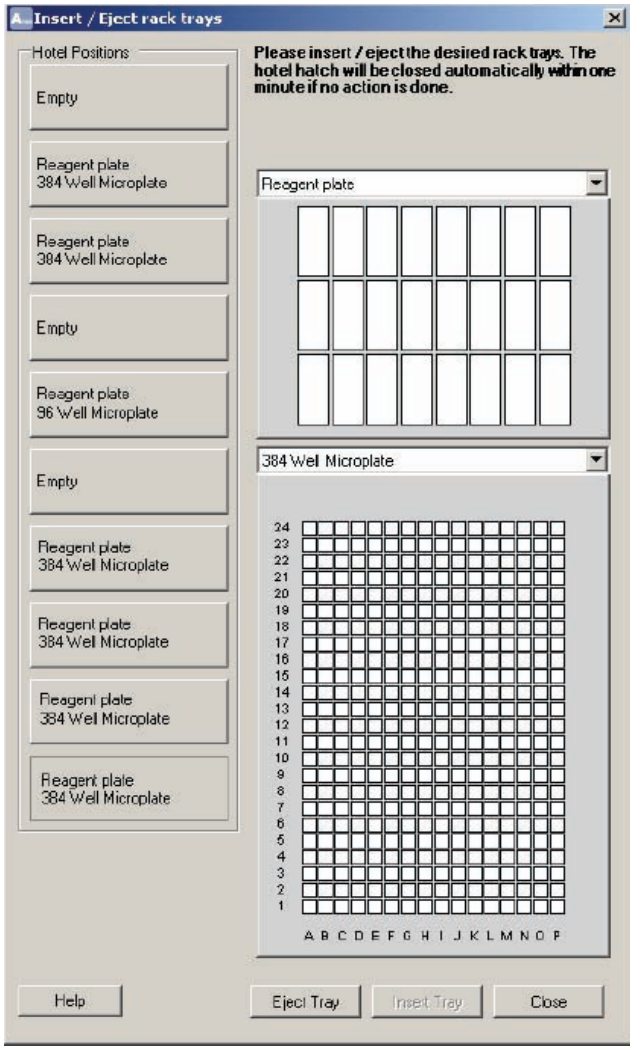
ラックトレイ左側壁に印字されている矢印とキャリアーに印字されている矢印が一致していることを確認する。

補足 6　ラックトレイ格納状況の確認

Toolbar→

をクリックする。

↓


Insert / Eject rack trays
Hotel Positions
Empty
Reagent plate 384 Well Microplate
Reagent plate 384 Well Microplate
Empty
Reagent plate 96 Well Microplate
Empty
Reagent plate 384 Well Microplate
Reagent plate 384 Well Microplate
Reagent plate 384 Well Microplate
Reagent plate 384 Well Microplate
Please insert / eject the desired rack trays. The hotel hatch will be closed automatically within one minute if no action is done.
Reagent plate
384 Well Microplate
A B C D E F G H I J K L M N O P
Help
Eject Tray
Insert Tray
Close

目的の位置を選択し **Eject Tray**、**Insert Tray** をクリックすることでラックトレイを配置する。

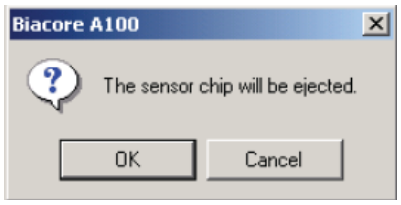
96 ウェルマイクロプレートと試薬プレートが格納されている場合
　"**Reagent plate 96 Well Microplate**"
384 ウェルマイクロプレートと試薬プレートが格納されている場合
　"**Reagent plate 384 Well Microplate**"
格納されていない場合
　"**Empty**"

2-2-3.　センサーチップの交換

Tool bar→

をクリックする。

↓



OK をクリックする。

↓

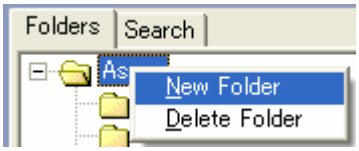
センサーチップポートが自動的に開く。
センサーチップを取り出し、新しいセンサーチップを挿入する。

↓

以降は 10 ページからを参照のこと。

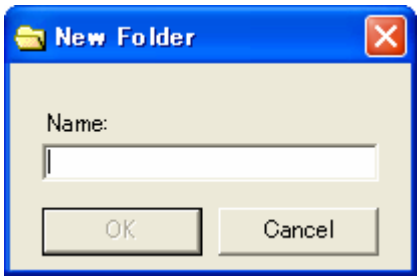
2-3.　データ保存用フォルダの作成

Assay フォルダを選択し、右クリックする。



New Folder を選択する。

↓



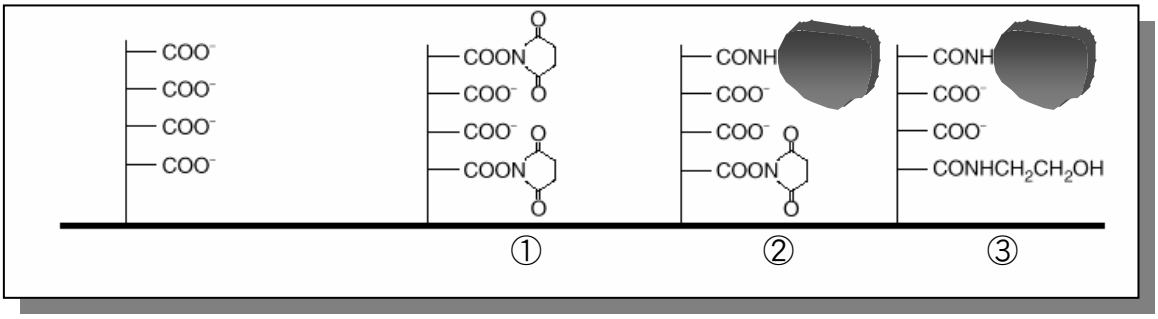
Name:にフォルダ名を入力し、**OK** をクリックする。
Assay フォルダ内に配置される。

3. 固定化

相互作用を検討する分子のうち、固定化もしくはキャプチャーする分子を**「リガンド」**と言う。リガンドの精製度は、リガンド結合の特異性やキャパシティーに大きく作用するので非常に重要な要因となる。90%以上の精製度のリガンドを使用する。

アミンカップリング法はリガンド表面に存在するアミノ基(N 末端アミノ基またはリジンの ε-アミノ基）を利用する 3 ステップの固定化法である。

① センサーチップ CM5 のカルボキシメチルデキストランへの NHS 基（N-ヒドロキシスクシンイミド）の導入
② リガンドのカップリング
③ エタノールアミンによる残存 NHS 基のブロッキング



＜準備するもの＞

Series S Sensor Chip CM5 (BR-1006-68)

Amine Coupling Kit type2 (BR-1006-33)

キットに添付されている説明書にしたがってい、EDC および NHS はそれぞれ 10 ml の超純水に溶解する。直ちに 200µl ずつマイクロチューブ等に分注し、蓋をして使用直前まで-20℃で冷凍保存する。使用直前に 1 組試薬を取り出し融解して使用する。融解後の試薬の再凍結・再使用はできない。

エタノールアミンは溶液。冷蔵（4℃）保存する。

BIAdesorb solution1、2 (BIAmaintenance Kit 中)

NaOH 50 (50 mM NaOH , BR-1003-58)

ランニング緩衝液

Tris や Glycine 緩衝液等の 1 級アミンを含まないもの。

リガンド

アジ化ナトリウム等の求核性物質、安定化剤としての共存タンパク質を含まないもの。

リガンド希釈液

タンパク質の場合は通常 5～200 µg/ml 程度になるよう **10 mM 酢酸緩衝液**で希釈して固定化を行う。酢酸緩衝液の pH は 26 ページのリガンド希釈液の pH 選択により決定する。

ペプチドや化合物等の低分子物質でプレコンセントレーション効果が見られない場合は 100 µg/ml 以上の濃度になるよう 10 mM Disodium tetraborate pH 8.5, 1 M NaCl で希釈し固定化する。

アミンカップリング以外の固定化方法、他のセンサーチップへの固定化方法については”Biacore 実験の手引き”、”Biacore　A100 Methodology Handbook”を参照のこと。

3-1. リガンドの必要固定化量

結合を確認するための測定は、アナライトの結合レスポンスが十分得られるような固定化量が必要になる。リガンドの固定化量とアナライトの結合レスポンスとの関係はそれぞれの分子量によって決まる。
固定化したリガンドにアナライトがすべて結合したときのレスポンスを、理論的最大結合量（Rmax）といい、以下の式で算出する。

$$\frac{\text{リガンドの固定化量 (RU)} \times S}{\text{リガンドの分子量 (Da)}} = \frac{\text{Rmax (RU)}}{\text{アナライトの分子量 (Da)}}$$

S はリガンドの結合部位数

（例）

リガンドの分子量	50,000 Da
リガンド固定化量	1,000 RU
リガンド結合部位数 S	1
アナライト分子量	20,000 Da

の場合、アナライトの最大結合量（Rmax）は以下となる。
アナライトの最大結合量 Rmax = (20,000 x 1,000 x 1) / 50,000 = 400 RU

最低でも Rmax が 50～100RU 以上になる固定化量を得る必要がある。

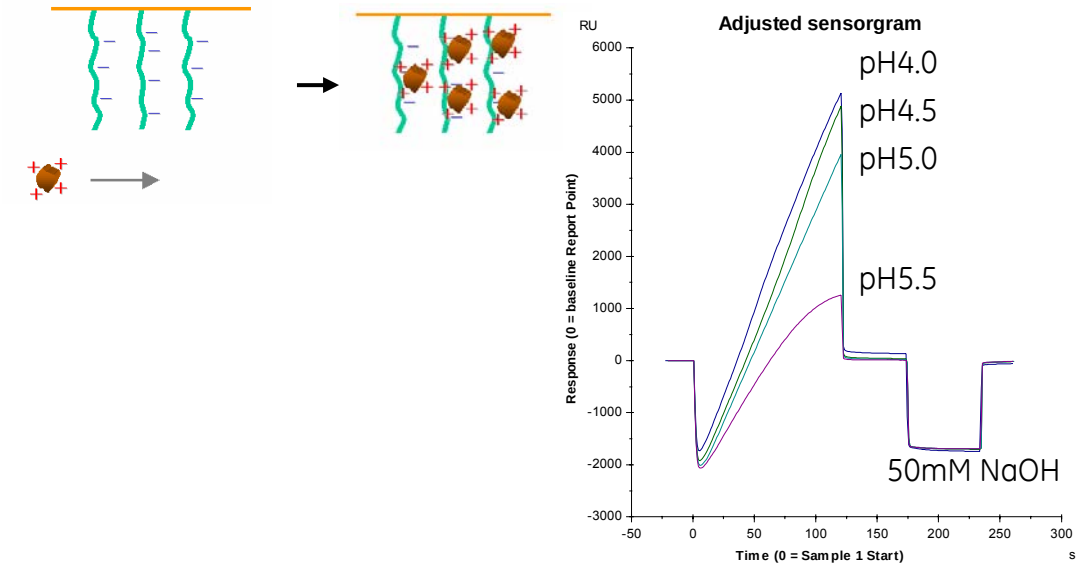
必要固定化量 = (Rmax x リガンドの分子量) / (アナライトの分子量 x S)

3-2. リガンド希釈液の pH 選択

固定化操作において、センサー表面のカルボキシメチルデキストランに存在するカルボキシル基は非常に重要である。リガンドを正に荷電した状態で添加すると、負に荷電しているカルボキシル基との間に静電気的な相互作用が生じ、リガンドをデキストラン中に濃縮することができる。これをプレコンセントレーション効果と呼んでいる。この方法を用いることで固定化効率を向上させることができる。したがってリガンドは等電点よりも低い pH の緩衝液に希釈し、リガンドを正に荷電させる必要がある。

等電点が既知のサンプルの場合は、リガンドの等電点よりも 1～2 低い pH 条件を使用すればよいが、等電点が不明な場合には、**pH Scouting** を行う。この操作は何も処理していないフローセルを使用して、各 pH におけるセンサー表面へのリガンドの濃縮程度を評価できる。

この操作によりリガンドは固定化されることはない。リガンドの添加が終了した後、高塩濃度のランニング緩衝液（例えば 150 mM NaCl を含む HBS 緩衝液）に置換されると、静電的に吸着したリガンドはチップ表面から速やかに解離する。しかしリガンドがデキストランに非特異的吸着を起こすこともあるので、操作終了後 50 mM NaOH で洗浄を行う。プレコンセントレーションに使用したセンサーチップはそのまま固定化に使用することができる。



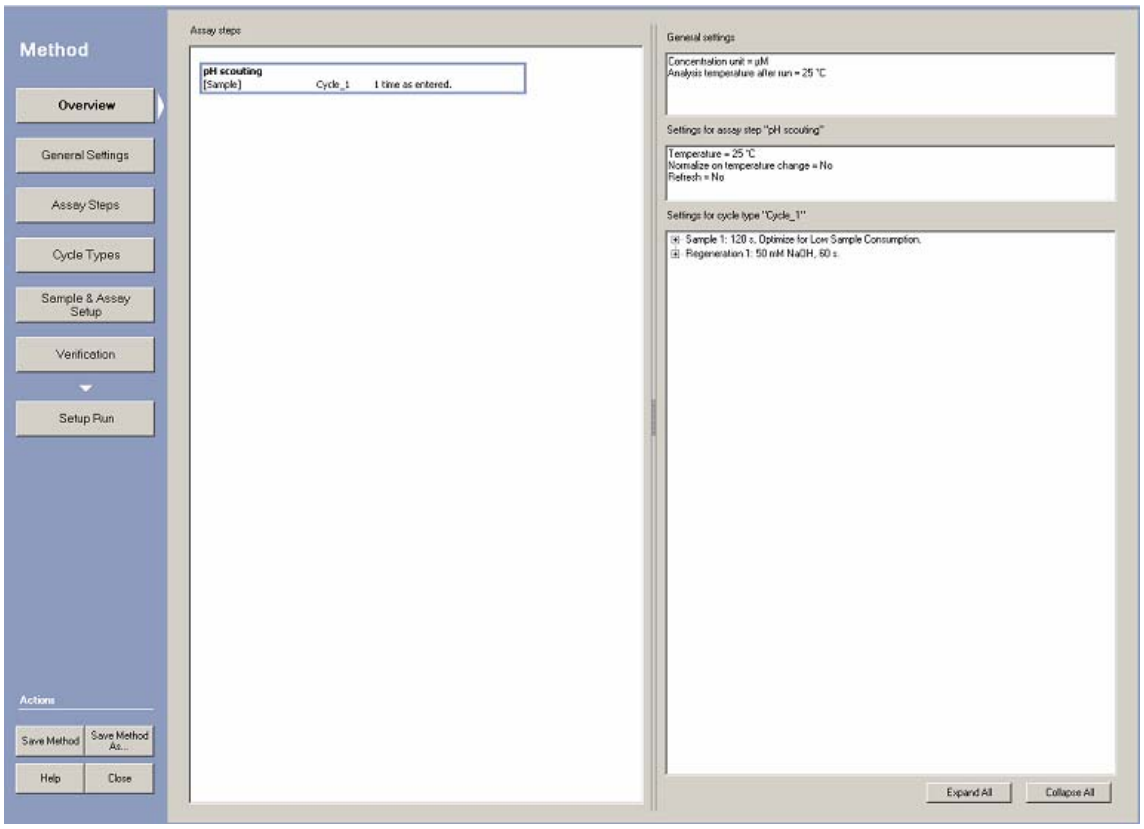
3-2-1.　リガンド希釈液の pH 選択の実行

ナビゲーションパネルの **New Method** をクリックする。

↓

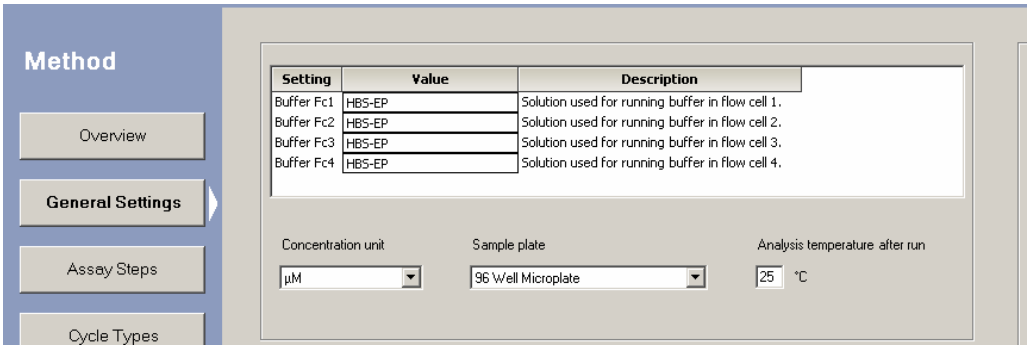
Surface Preparation フォルダ内の **pH Scouting** を選択し **OK** をクリックする。

↓



ナビゲーションパネルの **General Settings** をクリックする。

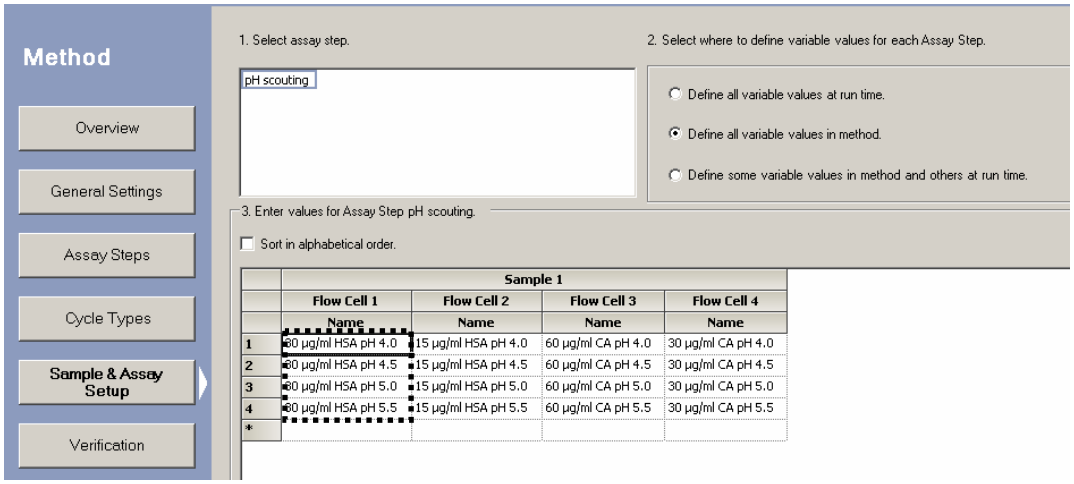
↓



Concentration unit に **µg/ml** を選択する。

↓

Sample & Assay Setup をクリックする。
固定化したいフローセルにテストするサンプル名を入力する。使用しないフローセルのカラムには”buffer”等を記入する。


Method
Overview
General Settings
Assay Steps
Cycle Types
Sample & Assay Setup
Verification
1. Select assay step.
pH scouting
2. Select where to define variable values for each Assay Step.
Define all variable values at run time.
Define all variable values in method.
Define some variable values in method and others at run time.
3. Enter values for Assay Step pH scouting.
Sort in alphabetical order.
Sample 1
Flow Cell 1
Flow Cell 2
Flow Cell 3
Flow Cell 4
Name
60 µg/ml HSA pH 4.0
15 µg/ml HSA pH 4.0
60 µg/ml CA pH 4.0
30 µg/ml CA pH 4.0
60 µg/ml HSA pH 4.5
15 µg/ml HSA pH 4.5
60 µg/ml CA pH 4.5
30 µg/ml CA pH 4.5
60 µg/ml HSA pH 5.0
15 µg/ml HSA pH 5.0
60 µg/ml CA pH 5.0
30 µg/ml CA pH 5.0
60 µg/ml HSA pH 5.5
15 µg/ml HSA pH 5.5
60 µg/ml CA pH 5.5
30 µg/ml CA pH 5.5

↓

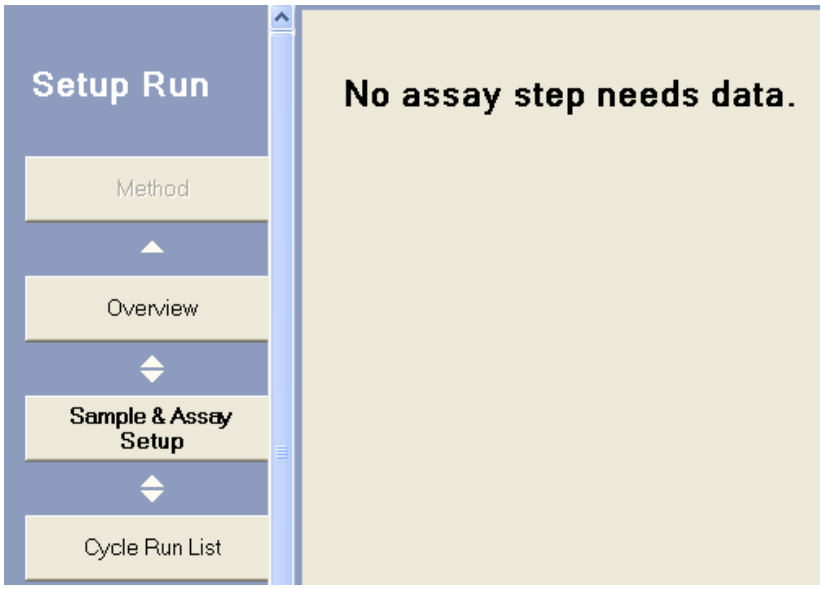
Verification をクリックし記入漏れがないことを確認する。

↓

Setup Run をクリックする。

↓

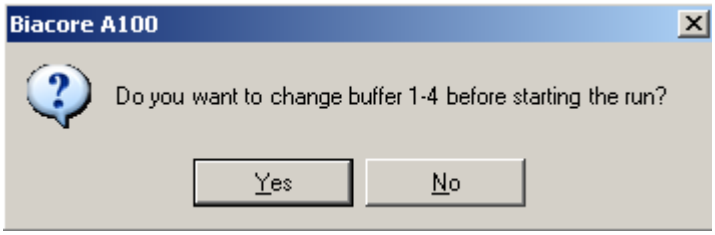
Sample & Assay Setup をクリックする。



↓

Cycle Run List をクリックする。

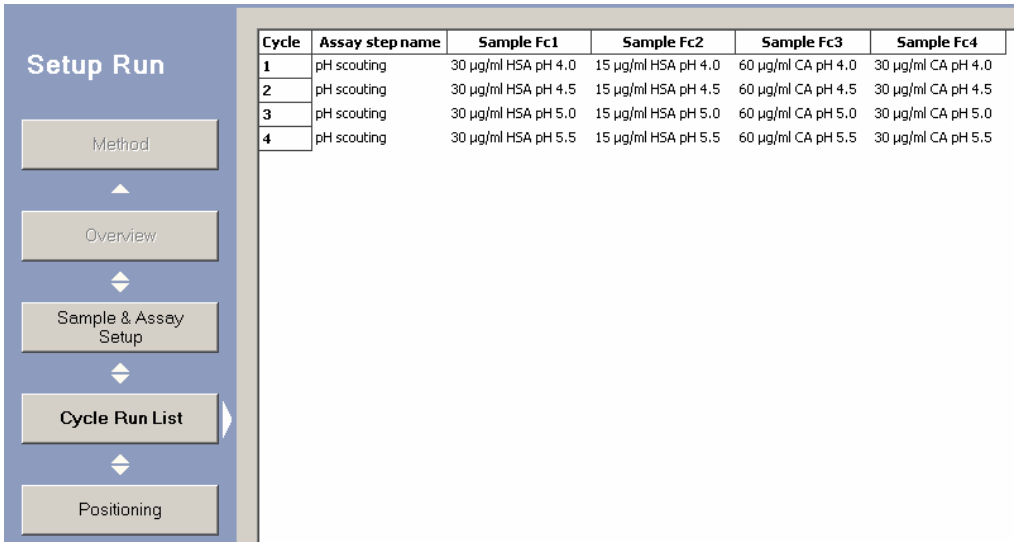
↓



特にランニング緩衝液の交換が必要でない場合は **No** をクリックする。

↓

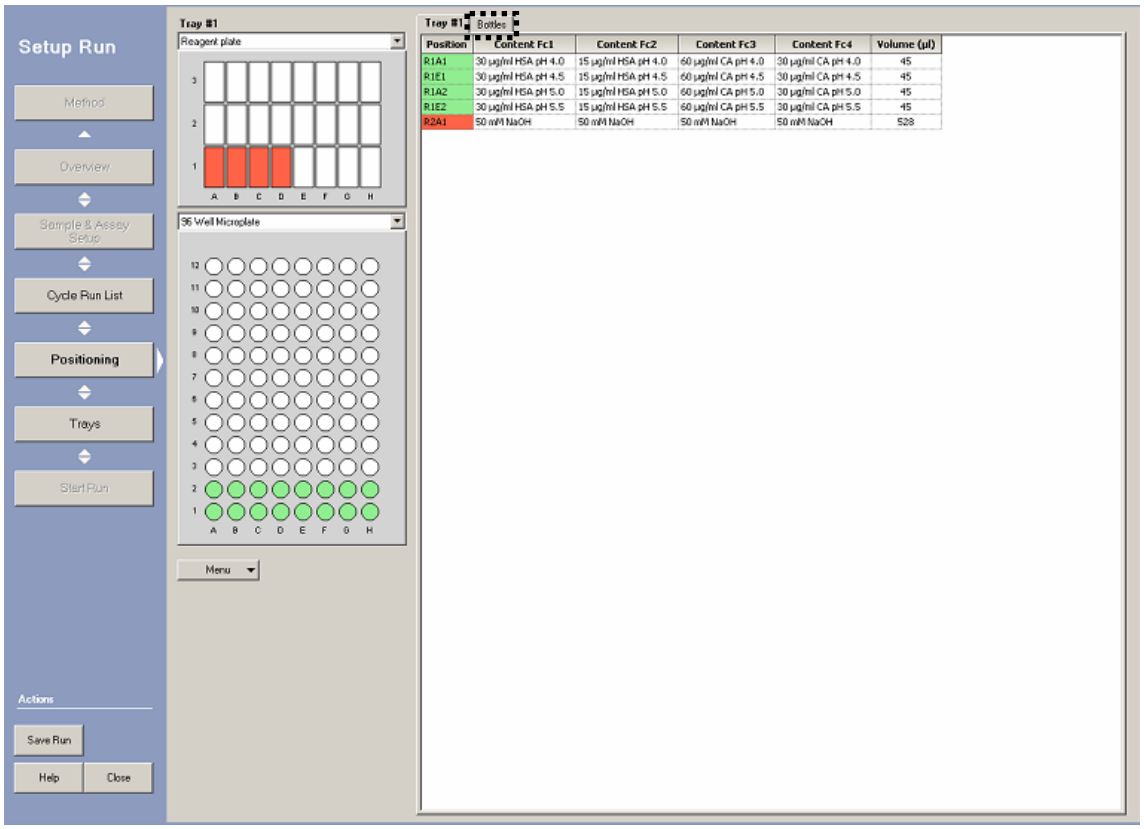
設定した測定の一覧表が表示される。



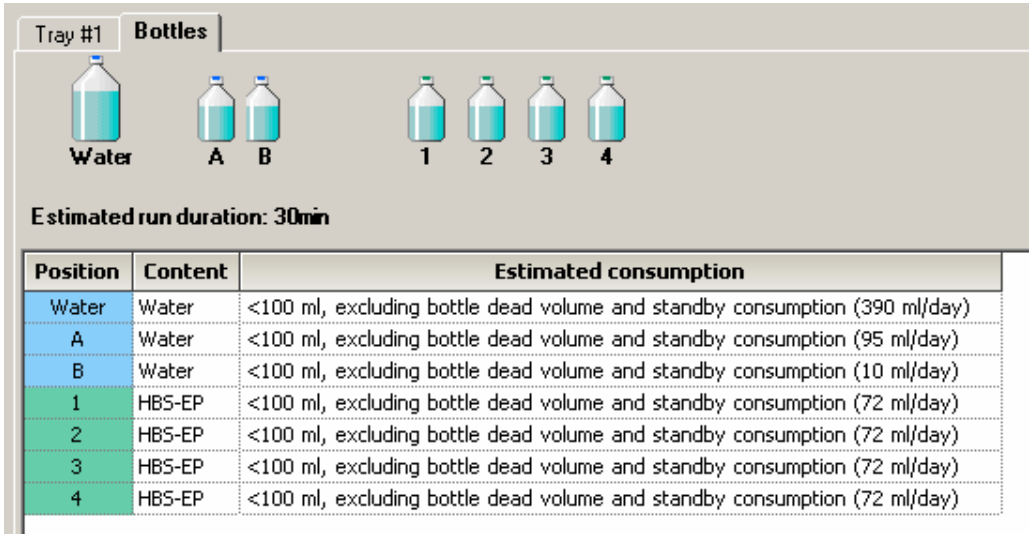
Cycle	Assay step name	Sample Fc1	Sample Fc2	Sample Fc3	Sample Fc4
1	pH scouting	30 µg/ml HSA pH 4.0	15 µg/ml HSA pH 4.0	60 µg/ml CA pH 4.0	30 µg/ml CA pH 4.0
2	pH scouting	30 µg/ml HSA pH 4.5	15 µg/ml HSA pH 4.5	60 µg/ml CA pH 4.5	30 µg/ml CA pH 4.5
3	pH scouting	30 µg/ml HSA pH 5.0	15 µg/ml HSA pH 5.0	60 µg/ml CA pH 5.0	30 µg/ml CA pH 5.0
4	pH scouting	30 µg/ml HSA pH 5.5	15 µg/ml HSA pH 5.5	60 µg/ml CA pH 5.5	30 µg/ml CA pH 5.5

↓

Positioning をクリックする。



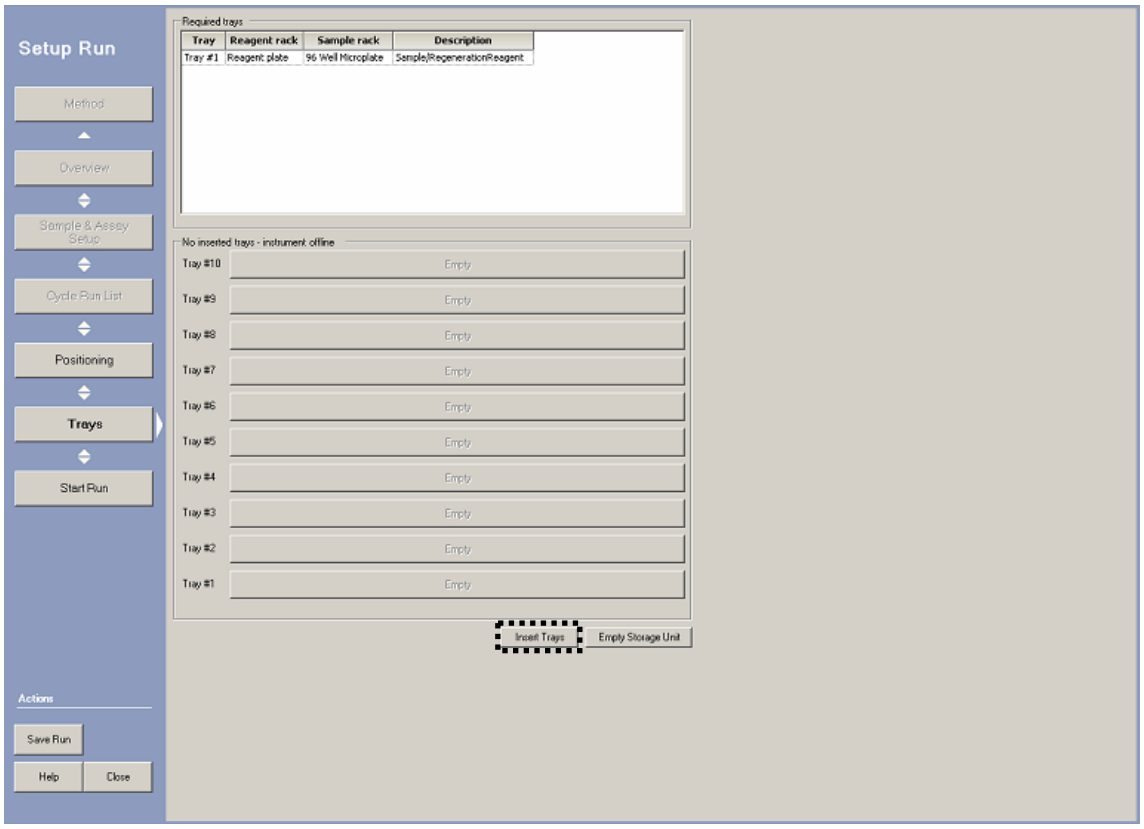
Bottles タブをクリックすると各緩衝液、超純水の必要量が表示される。



指示通りに試薬、サンプルをプレートに分注しボトルの準備をする。

↓

Trays をクリックする。

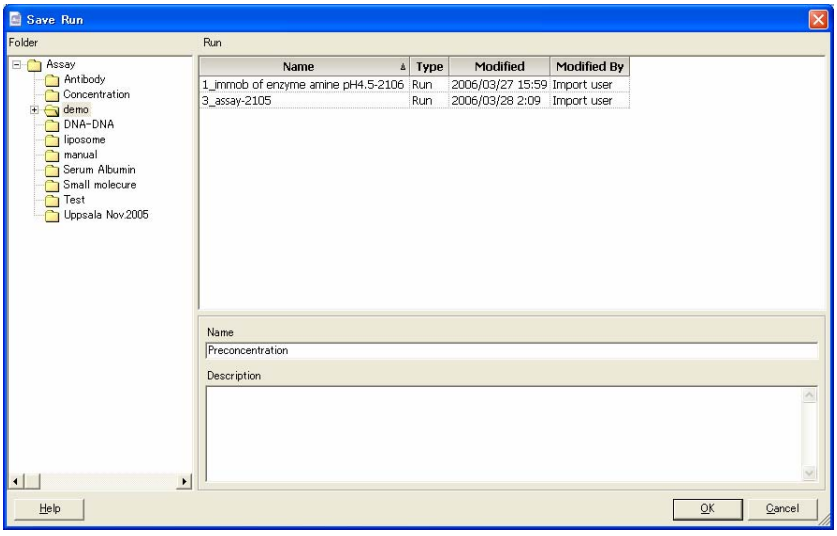


Insert Trays をクリックし試薬、サンプルをセットしたラックトレイを装置内に入れる。

↓

Start Run をクリックする。

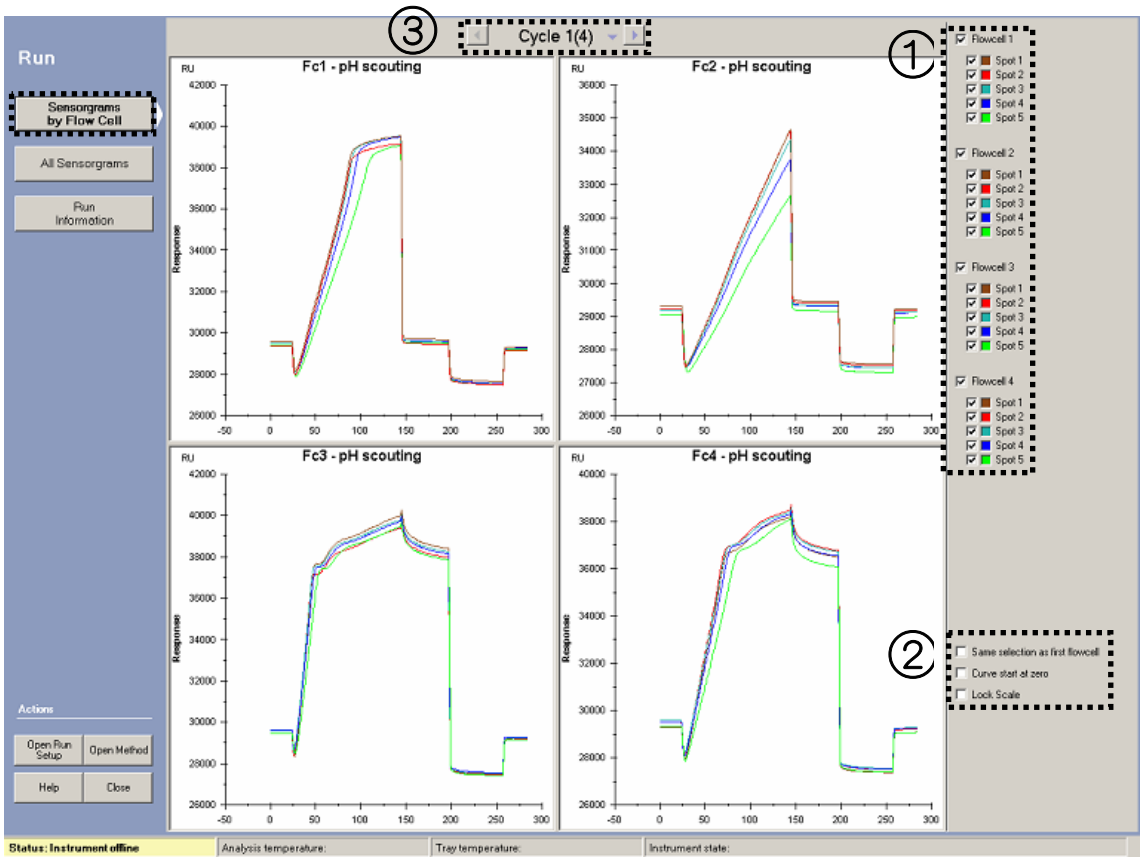
↓



保存先のフォルダを指定する。ファイル名を入力し **OK** をクリックすると測定がスタートする。

3-2-2.　pH 選択の結果評価

ナビゲーションパネルの **Sensorgrams by Flow Cell** で各フローセルのデータを確認する。



① 評価したいフローセルのスポット 3 以外のチェックをはずす。

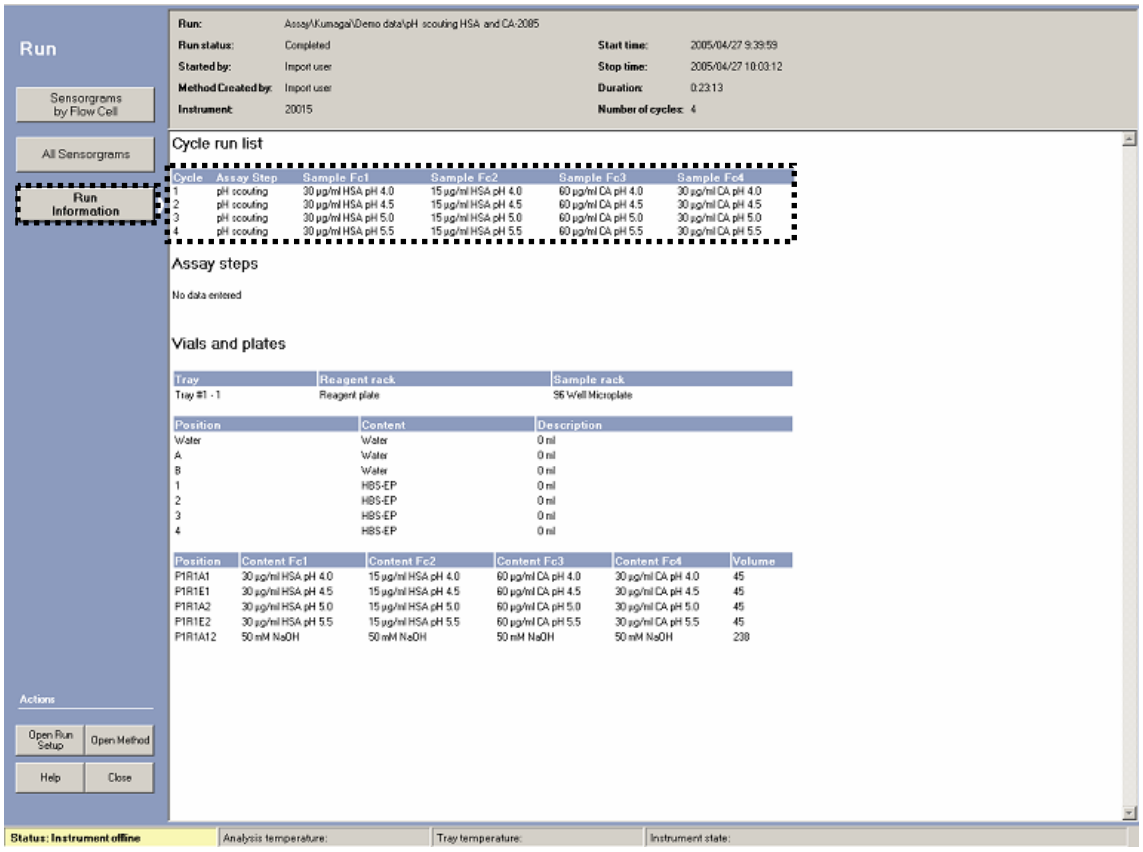
↓

② **Curve start at zero** にチェックを入れる。
全センサーグラムのスタート位置が 0 にそろう。

↓

③ 表示する測定サイクルを変更し、各センサーグラムを確認する。

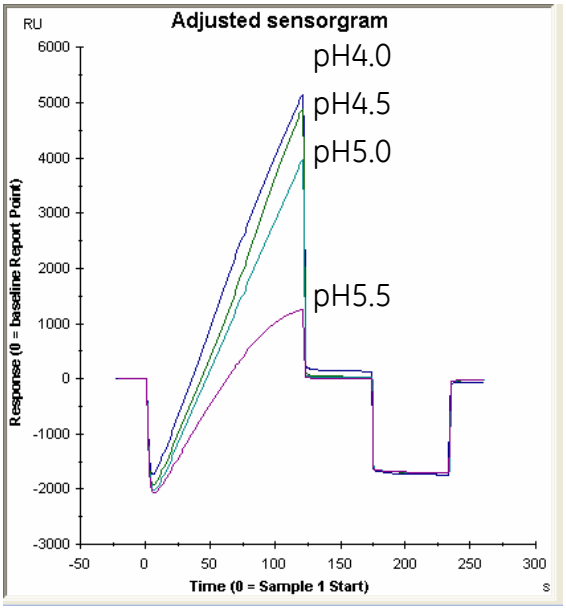
ナビゲーションパネルの **Run Information** をクリックするとすべての測定情報が表示される。



＜結果の評価＞

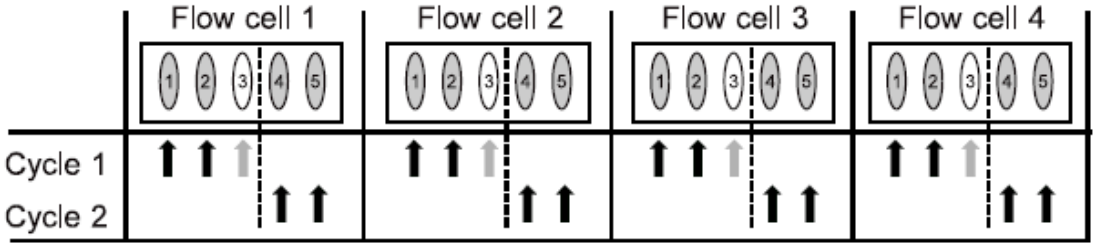
プレコンセントレーション効果は希釈緩衝液の pH を下げれば増加する。しかし低い pH 環境下では NHS 基とアミノ基とのカップリング効率は減少する。

右のセンサーグラムの場合 pH 4.0, 4.5 の方が pH 5.0 に比べ速い速度でプレコンセントレーションしているが、必ずしも pH 4.0 の固定化量が多いとは限らない。またリガンドの安定性のためにも高 pH を使用すべきである。ここでは濃縮効果が認められる一番高い pH の pH 5.0 条件を使用する。pH 4.0 でプレコンセントレーション効果が得られない場合には表面チオールカップリングあるいはビオチン化して SA チップに固定化する。

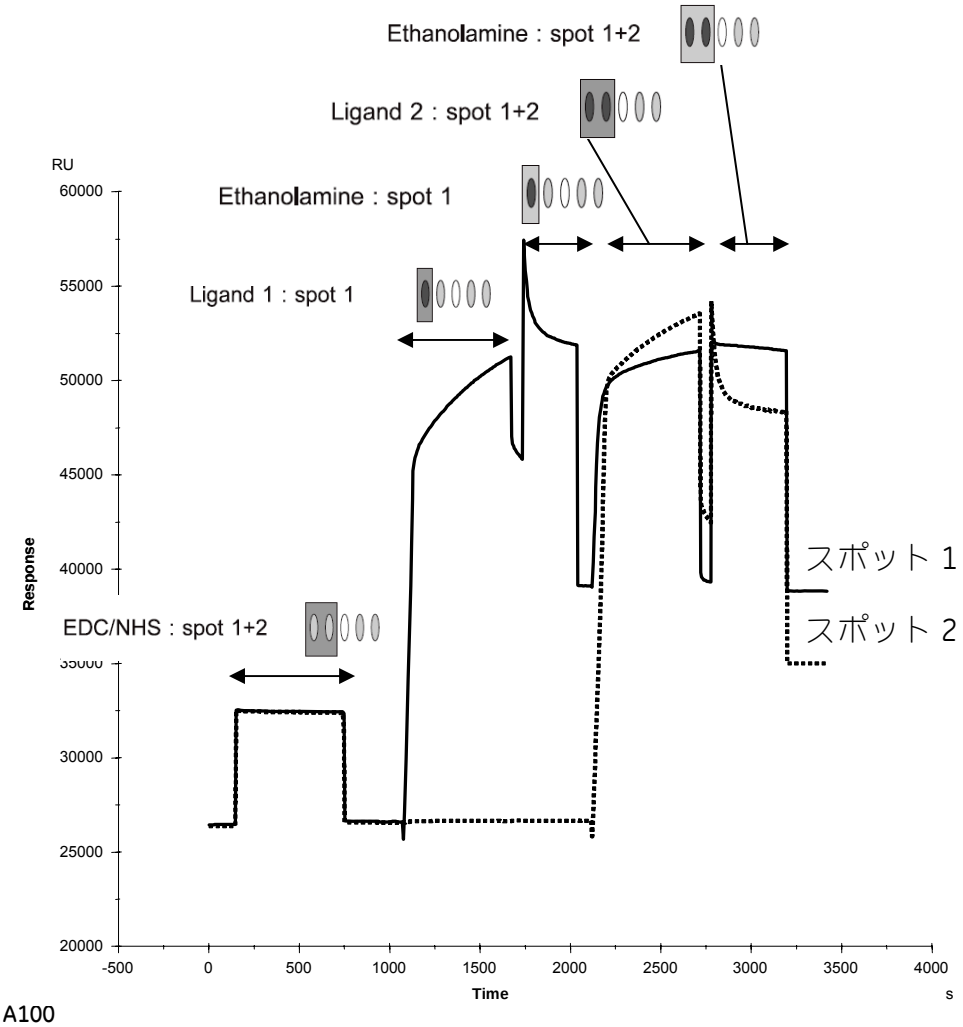


3-3. 固定化操作

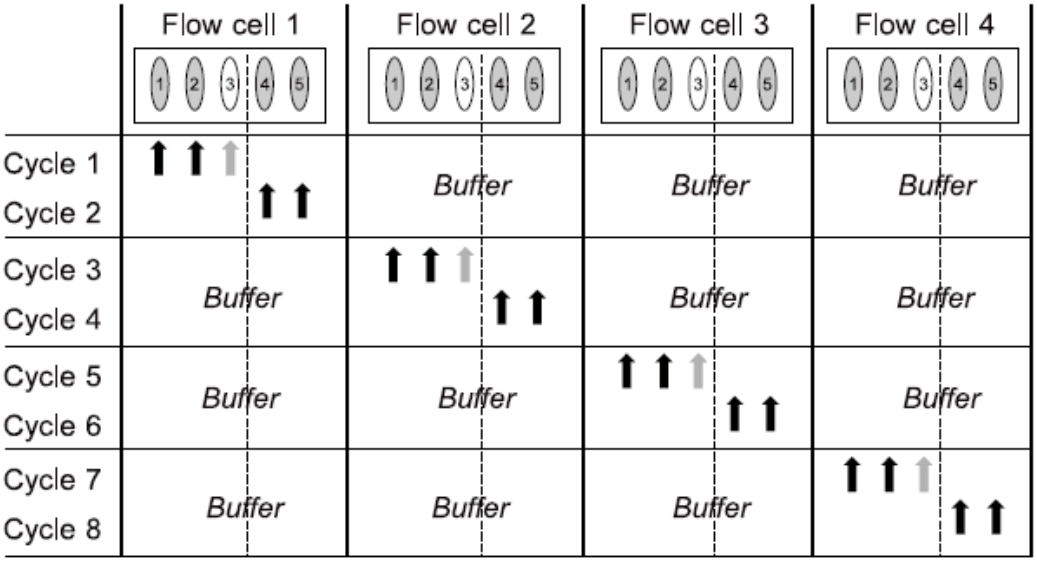
1 フローセルあたり最大 5 つのスポットに固定化することができる。
各スポットは物理的な隔壁がないため、ハイドロダイナミックアドレッシング（HA）方式を利用して固定化する。
5 つのスポットすべてに固定化する際には、1 サイクル目にスポット 1→2→3 の順番で固定化し、2 サイクル目にスポット 5→4 の順番で固定化する。固定化は外側のスポットから実行し、通常スポット 3 はリファレンスとして使用する。



下図はアミンカップリング法にてスポット 1、2 に異なるリガンドを固定化したときのセンサーグラムである。



各フローセル間で固定化プロトコルが異なる場合は全フローセル、全スポットへの固定化は 8 サイクルを要す。



アミンカップリング等のセンサー表面に NHS 基を導入する固定化法ではスポット 1、2 間およびスポット 4、5 間の固定化量に差が生じる。これは NHS 化から固定化までの時間差に起因するものであり、スポット 2、4 の固定化量はスポット 1、5 の 50～60%程度になる。
低 pH は NHS の失活速度を抑える作用がある。10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 pH 4.5 , 150 mM NaCl , 0.05% surfactant P20 を固定化用緩衝液として使用すると、スポット 2、4 の固定化量は 75%～85%程度になる。
1 種類のみ固定化する場合には、ランニング緩衝液を固定化用緩衝液にする。

3-3-1. 固定化の実行

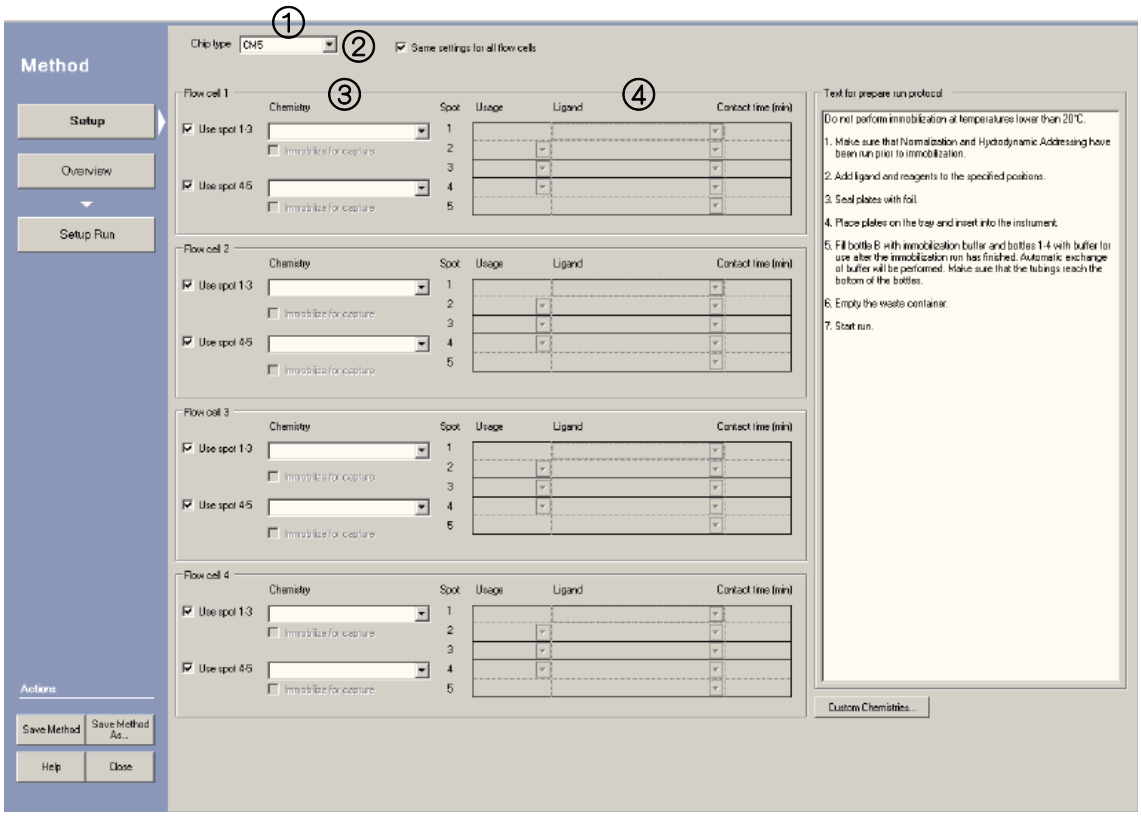
ナビゲーションパネルの **New Method** をクリックする。

↓

Surface Preparation / Immobilization / New Immobilization method を選択し **OK** をクリックする。

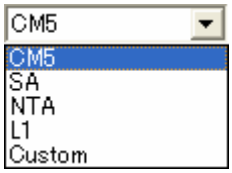
↓

Setup ウィンドウが表示される。


①
②
③
④
Method
Setup
Overview
Setup Run
Actions
Save Method
Save Method As...
Help
Close
Chip type
CM5
Same settings for all flow cells
Flow cell 1
Flow cell 2
Flow cell 3
Flow cell 4
Chemistry
Spot
Usage
Ligand
Contact time (min)
Use spot 1-3
Use spot 4-5
Immobilize for capture
Text for prepare run protocol
Do not perform immobilization at temperatures lower than 20°C.
1. Make sure that Normalization and Hydrodynamic Addressing have been run prior to immobilization.
2. Add ligand and reagents to the specified positions.
3. Seal plates with foil.
4. Place plates on the tray and insert into the instrument.
5. Fill bottle B with immobilization buffer and bottles 1-4 with buffer for use after the immobilization run has finished. Automatic exchange of buffer will be performed. Make sure that the tubings reach the bottom of the bottles.
6. Empty the waste container.
7. Start run.
Custom Chemistries...

①：**Chip type**

使用するセンサーチップを選択する。（CM5 , SA , NTA , L1 , Custom）

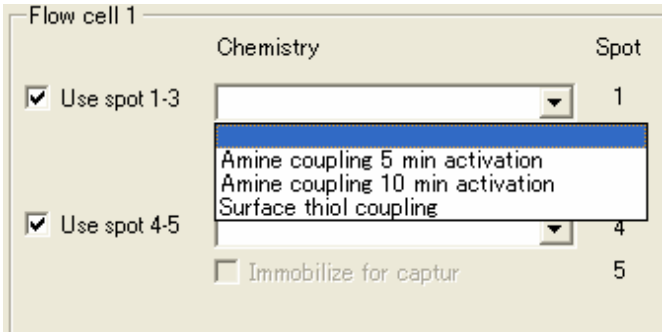


②：**Same Settings for all flow cells**

全フローセルの固定化条件を同じにする場合はチェックを入れる。

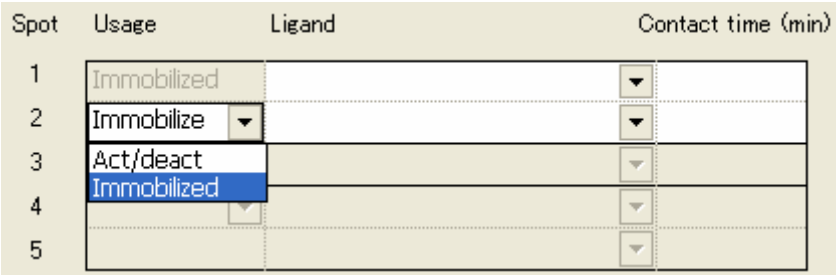
③：**Chemistry**

アミンカップリング：活性化 5 分間プロトコル、活性化 10 分間プロトコル
表面チオールカップリングの 3 つから選択する。



④：**Spot , Usage , Ligand , Contact time (min)**

固定化するスポット、リガンド名、リガンド添加時間の設定を行う。
Usage はスポット 2 、3 、4 で設定可能である。



スポット 2 , 4 ：

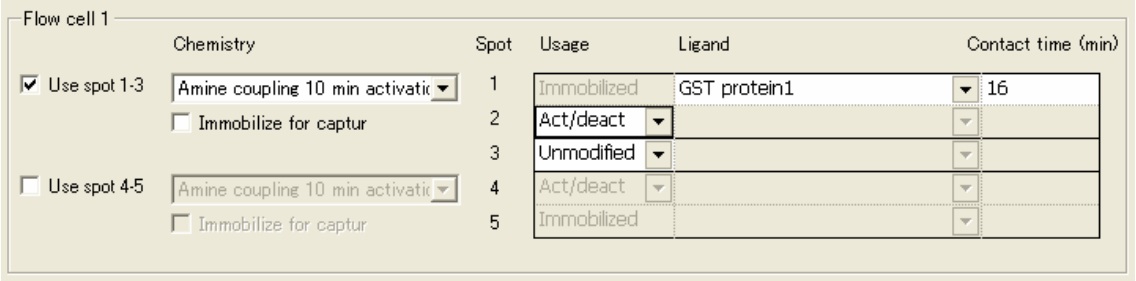
Immobilized　：固定化
Act/deact　：活性化/ブロッキング処理

スポット 3　；

Immobilized　：固定化
Act/deact　：活性化/ブロッキング処理
Unmodified　：未処理

3-3-1-1.　1 つのスポットへの固定化方法

フローセル 1 のスポット 1 に固定化する場合について説明する。他のフローセルにも固定化する場合には、そのフローセルの設定を同様に進める。



スポット 2 は活性化/ブロッキング処理を行う。Act/deact を選択する。
リガンド名、リガンド添加時間を入力し **Overview** をクリックする。

↓

Setup Run をクリックする。

↓

Ligand overview

Spot	Flow cell 1	Flow cell 2	Flow cell 3	Flow cell 4
1	GST protein1	-	-	-
2	(Act/deact)	-	-	-
3	(Unmodified)	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-

Run Order

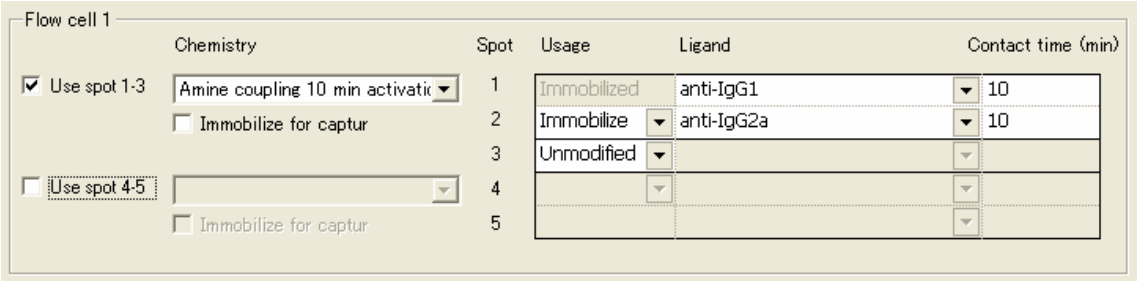
Cycle 1						
Chemistry:	Amine coupling 10 min activation					
Flow cells:	1					
Spots:	1-3					
Ligand injection	**Contact time(min)**	**Spot**	**Flow cell 1**	**Flow cell 2**	**Flow cell 3**	**Flow cell 4**
1	16	1	GST protein1	(buffer)	(buffer)	(buffer)

↓

Positioning（チューブ B に固定化用緩衝液を指定量セットする）→**Trays**→**Run** の順で設定を進め、測定を開始する。

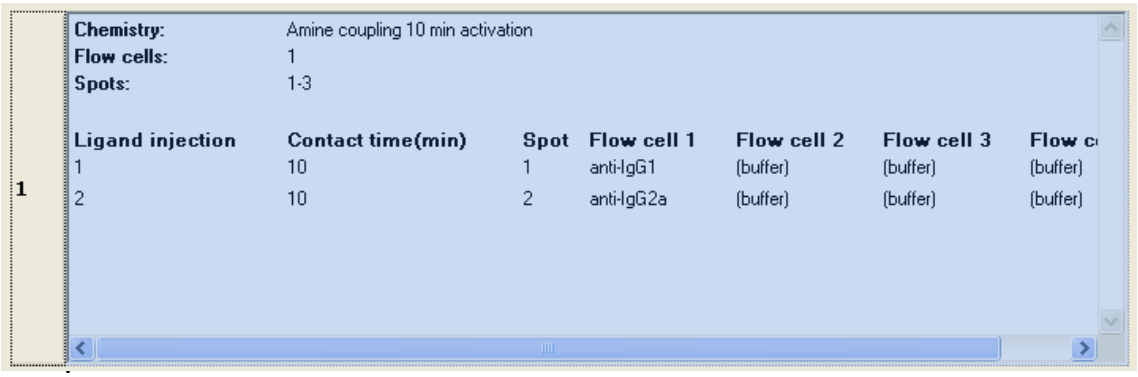
3-3-1-2.　2 つのスポットへの同時固定化方法

フローセル 1 のスポット 1、2 に固定化する場合について説明する。
他のフローセルにも固定化する場合にはそのフローセルの設定を同様に進める。

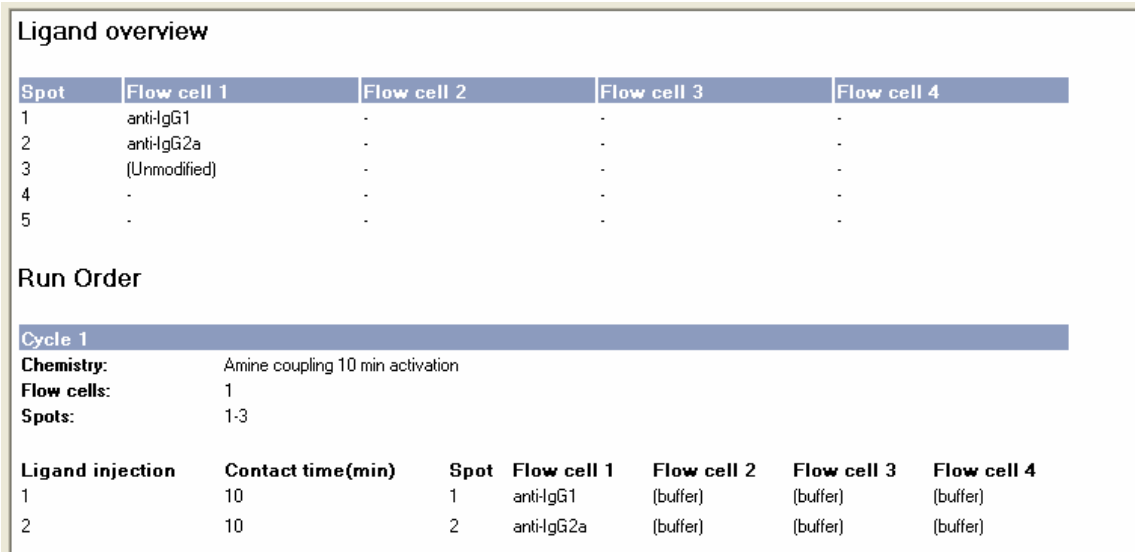


リガンド名、リガンド添加時間を入力し **Overview** をクリックする。

↓



↓

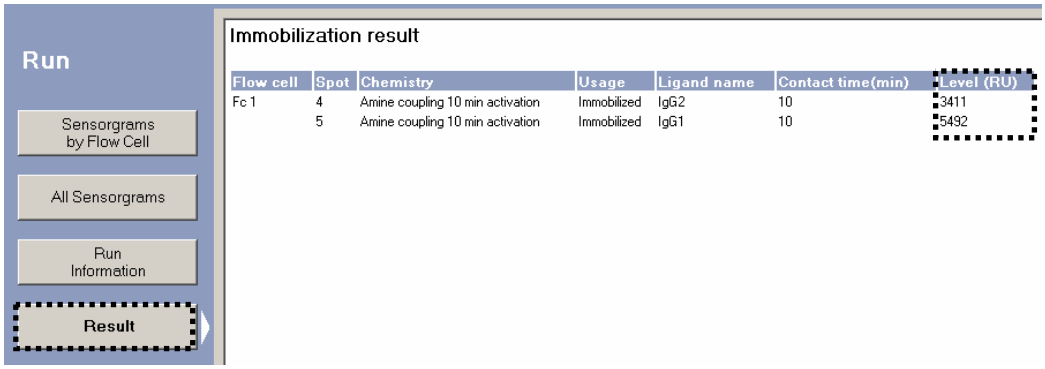


↓

Positioning→**Trays**→**Run** の順で設定を進め、測定を開始する。

3-3-2. 固定化量の確認

固定化操作が終了するとナビゲーションパネルの **Result** が選択され、フローセルごとに各スポットの固定化量が表示される。

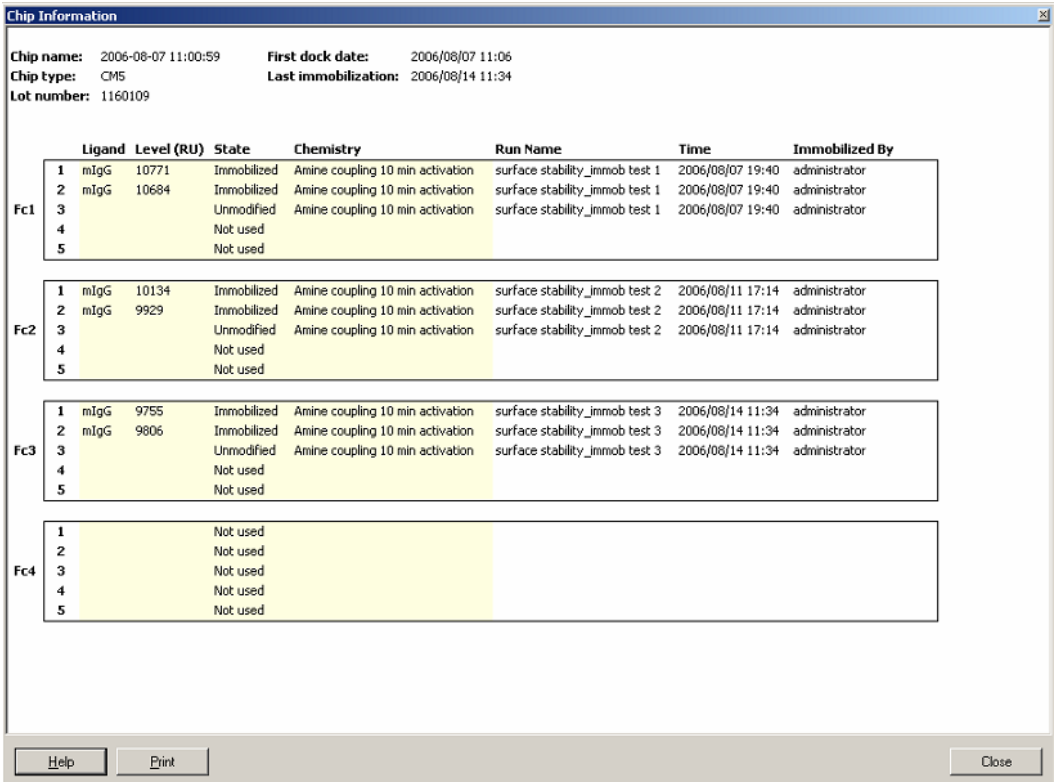

Run
Sensorgrams by Flow Cell
All Sensorgrams
Run Information
Result
Immobilization result
Flow cell | Spot | Chemistry | Usage | Ligand name | Contact time(min) | Level (RU)
Fc 1 | 4 | Amine coupling 10 min activation | Immobilized | IgG2 | 10 | 3411
5 | Amine coupling 10 min activation | Immobilized | IgG1 | 10 | 5492

固定化時のセンサーグラムを確認する場合は **Sensorgrams by Flow Cell**、または **All Sensorgrams** をクリックする。

3-3-3. センサーチップの固定化状況の確認

Tool bar の

をクリックする。

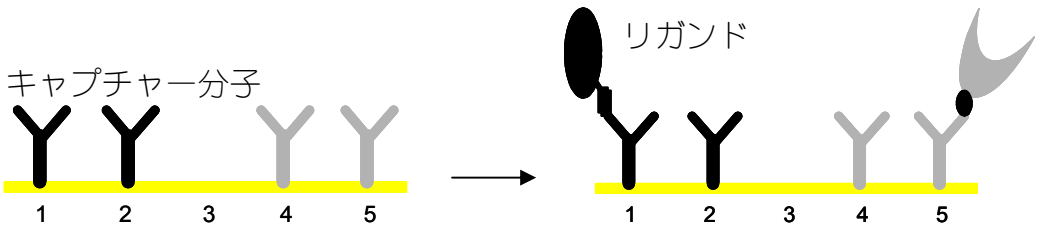

Chip Information
Chip name: 2006-08-07 11:00:59
Chip type: CM5
Lot number: 1160109
First dock date: 2006/08/07 11:06
Last immobilization: 2006/08/14 11:34
Ligand | Level (RU) | State | Chemistry | Run Name | Time | Immobilized By
Fc1
1 mIgG 10771 Immobilized Amine coupling 10 min activation surface stability_immob test 1 2006/08/07 19:40 administrator
2 mIgG 10684 Immobilized Amine coupling 10 min activation surface stability_immob test 1 2006/08/07 19:40 administrator
3 Unmodified Amine coupling 10 min activation surface stability_immob test 1 2006/08/07 19:40 administrator
4 Not used
5 Not used
Fc2
1 mIgG 10134 Immobilized Amine coupling 10 min activation surface stability_immob test 2 2006/08/11 17:14 administrator
2 mIgG 9929 Immobilized Amine coupling 10 min activation surface stability_immob test 2 2006/08/11 17:14 administrator
3 Unmodified Amine coupling 10 min activation surface stability_immob test 2 2006/08/11 17:14 administrator
4 Not used
5 Not used
Fc3
1 mIgG 9755 Immobilized Amine coupling 10 min activation surface stability_immob test 3 2006/08/14 11:34 administrator
2 mIgG 9806 Immobilized Amine coupling 10 min activation surface stability_immob test 3 2006/08/14 11:34 administrator
3 Unmodified Amine coupling 10 min activation surface stability_immob test 3 2006/08/14 11:34 administrator
4 Not used
5 Not used
Fc4
1 Not used
2 Not used
3 Not used
4 Not used
5 Not used
Help
Print
Close

各フローセル、スポットの固定化履歴が確認できる。

補足 7　キャプチャー法のための固定化

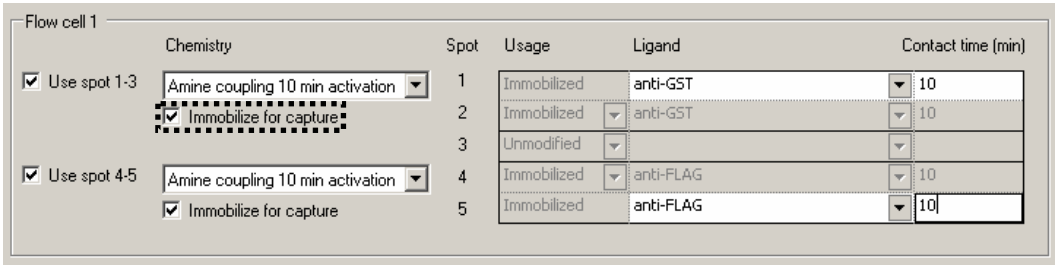
キャプチャー法はリガンドに結合するキャプチャー分子を利用した固定化方法である。リガンドが組換えタンパク質でタグを有していれば、そのタグに対する抗体（抗 GST 抗体、抗 FLAG 抗体等）、またリガンドが抗体であればその抗体に対する抗体や親和性のあるタンパク質（抗マウス抗体、protein A , protein G 等）を利用する。

キャプチャー分子の固定化は 2 スポット同時に行う。相互作用測定時には外側（スポット 1、5）にリガンドをキャプチャーし、内側（スポット 2、4）はリファレンスとして使用する。



＜固定化メソッドの設定＞

Immobilize for capture にチェックを入れる。



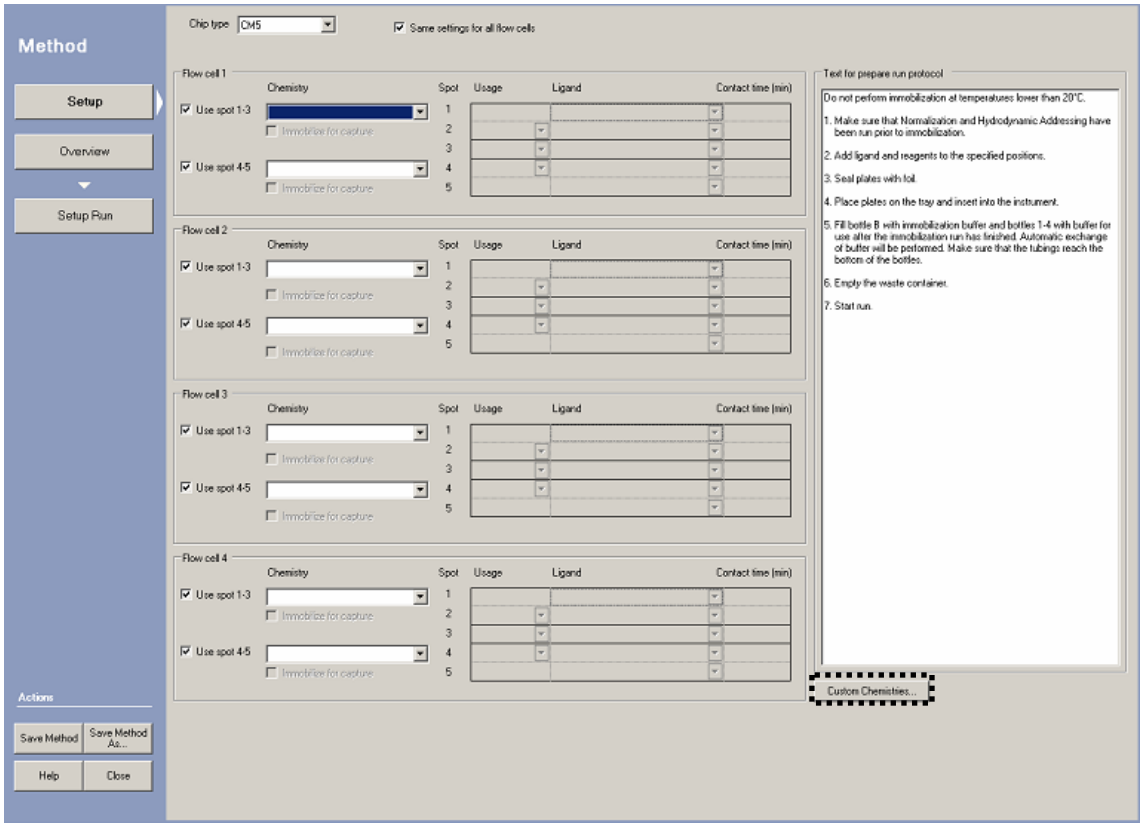
スポット 1、5 のリガンド名、添加時間を入力すると自動的にスポット 2、4 も同じ設定になる。

補足 8　オリジナル固定化メソッドの作成

固定化プロトコルを任意に作成する場合に使用する。

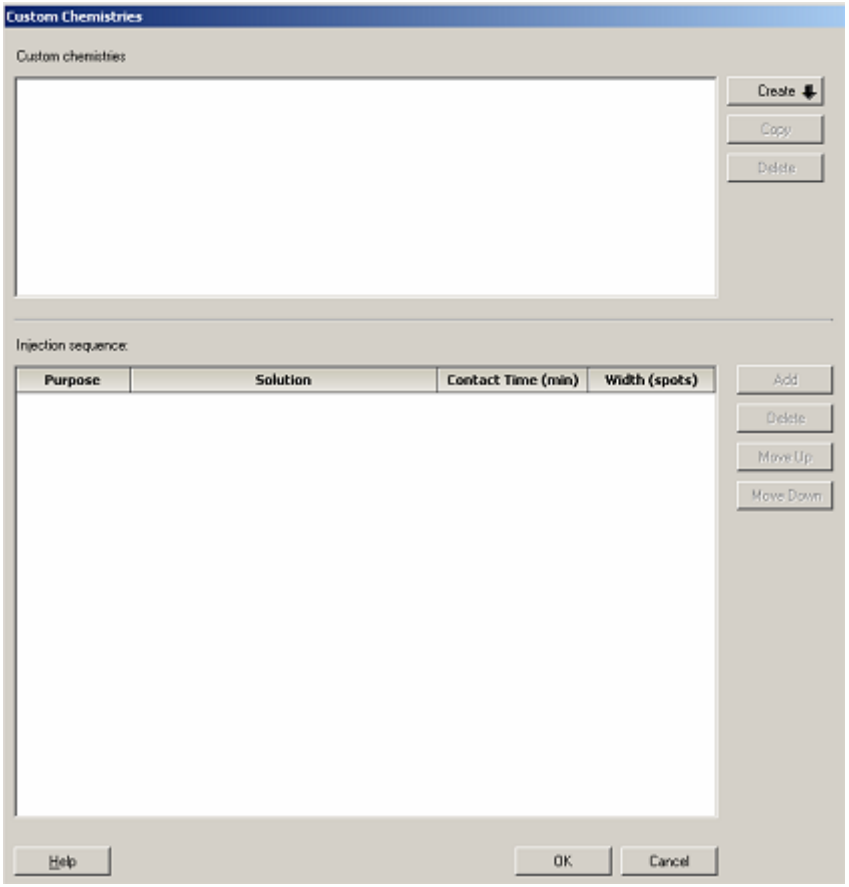
New Immobilization Wizard を開く。

↓

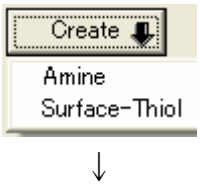

Method
Setup
Overview
Setup Run
Actions
Save Method
Save Method As...
Help
Close
Chip type CM5
Same settings for all flow cells
Flow cell 1
Flow cell 2
Flow cell 3
Flow cell 4
Chemistry
Spot
Usage
Ligand
Contact time (min)
Use spot 1-3
Use spot 4-5
Immobilize for capture
Text for prepare run protocol
Do not perform immobilization at temperatures lower than 20°C.
1. Make sure that Normalization and Hydrodynamic Addressing have been run prior to immobilization.
2. Add ligand and reagents to the specified positions.
3. Seal plates with foil.
4. Place plates on the tray and insert into the instrument.
5. Fill bottle B with immobilization buffer and bottles 1-4 with buffer for use after the immobilization run has finished. Automatic exchange of buffer will be performed. Make sure that the tubings reach the bottom of the bottles.
6. Empty the waste container.
7. Start run.
Custom Chemistries...

画面右下の **Custom Chemistries...**をクリックする。

↓

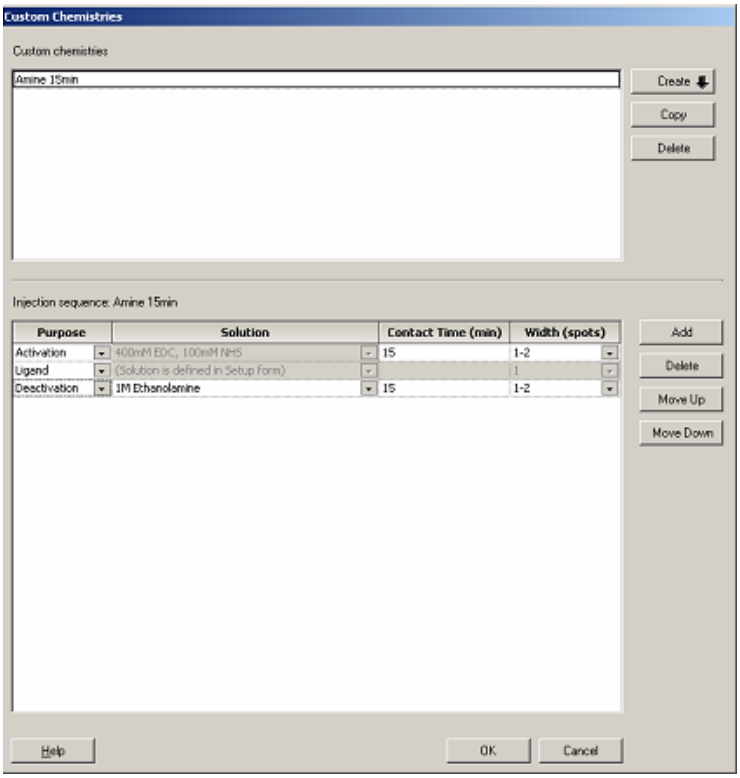


Create↓から **Amine** もしくは **Surface-Thiol** を選択する。

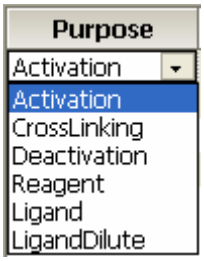


↓

Custom Chemistries に作成するプロトコルの名前を入力する。
Injection sequence: でプロトコルを作成する。



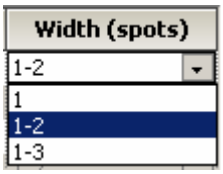
Purpose のプルダウンメニューから添加目的を選択する。



Activation　：EDC/NHS の添加
CrossLinking　：架橋試薬の添加
Deactivation　：不活性化試薬の添加
Reagent　：試薬の添加
Ligand　：リガンドの添加
LigandDilute　：リガンドを固定化緩衝液と混合後添加

↓

Width のプルダウンメニューから添加するスポットを選択する。



1

スポット 1～3 に固定化する場合：スポット 1 のみ流れる。
スポット 4～5 に固定化する場合：スポット 5 のみ流れる。

1 - 2

スポット 1～3 に固定化する場合：スポット 1、2 に流れる。
スポット 4～5 に固定化する場合：スポット 4、5 に流れる。

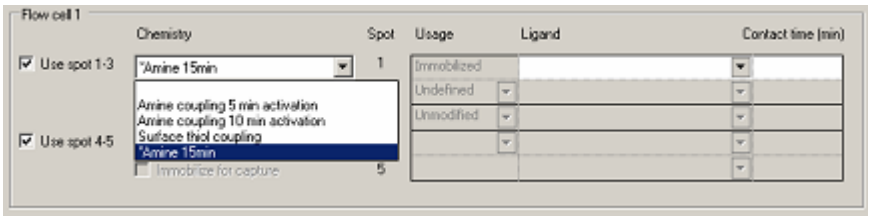
1 - 3

スポット 1～3 に固定化する場合：スポット 1、2、3 に流れる。
スポット 4～5 に固定化する場合は使用できない。

添加コマンドを追加する場合には **Add**、削除する場合には **Delete** をクリックする。また順序の変更は **Move Up** ,**Move Down** で行う。

↓

作成した固定化プロトコルは New Immobilization Wizard 内の Chemistry で選択可能になる。

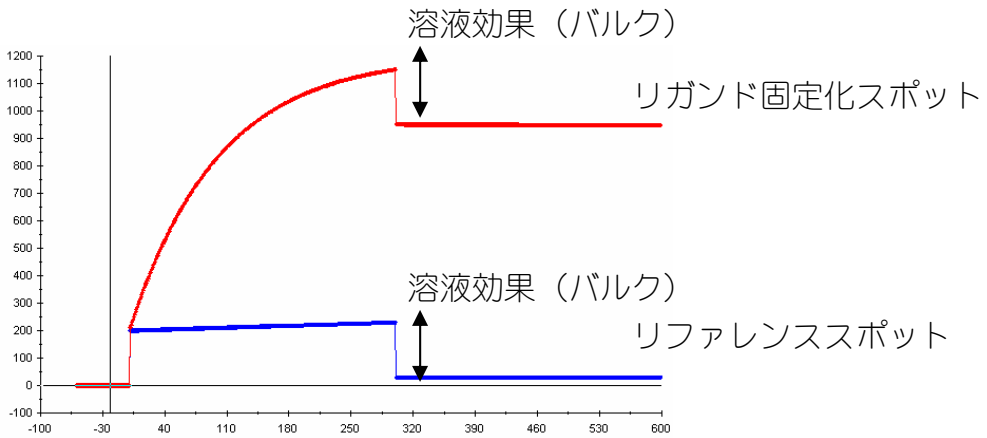


アミンカップリング以外の固定化方法に関しては Biacore A100 Methodology Handbook の Surface preparation の項を参照のこと。

4.　相互作用測定のための条件検討

リガンドを固定化したセンサーチップに対して、リガンドとの結合を測定する目的で添加する分子を**アナライト**という。アナライトは血清や培養上清等のクルード（crude）なサンプルを使用することができるが、不溶性の粒子等は遠心などで除去する必要がある。特異的な結合を判断するためには、必ずリガンド固定化スポットからリファレンススポットを差し引いたセンサーグラムで評価する。反応速度定数や解離定数の算出を目的とした測定の場合は、精製した既知濃度のアナライトを使用する。アナライトはランニング緩衝液で希釈する。希釈できない場合は、ランニング緩衝液にバッファー交換するか、ランニング緩衝液自体をアナライト溶解液条件にあわせることが必要となる場合がある。緩衝液が異なる場合には、溶液効果（バルク：流れている緩衝液の密度の差により発生するレスポンス）が発生する。溶液効果はスクリーニングのように結合の有無を評価する測定においては問題とならないが、反応速度定数や解離定数の算出を目的とした測定では、結合領域と解離領域が異なる緩衝液組成条件下で、結合速度定数と解離速度定数を算出し、解離定数として合算することになるため好ましくない。

アナライト濃度は結合の強さや分子量にもよるが、およそ数十 ng/ml～数百 µg/ml で行う。反応速度定数を算出する場合には予想される K_D（解離定数）値濃度の 1/10～10 倍の濃度で測定すると良好な結果が得られる。しかし予備検討時は、結合が弱いことや再生条件（リガンドに結合したアナライトを溶出する操作）を検討する必要性を考慮し、高濃度（タンパク質アナライトの場合、数～数十 µg/ml）を用いるのが望ましい。



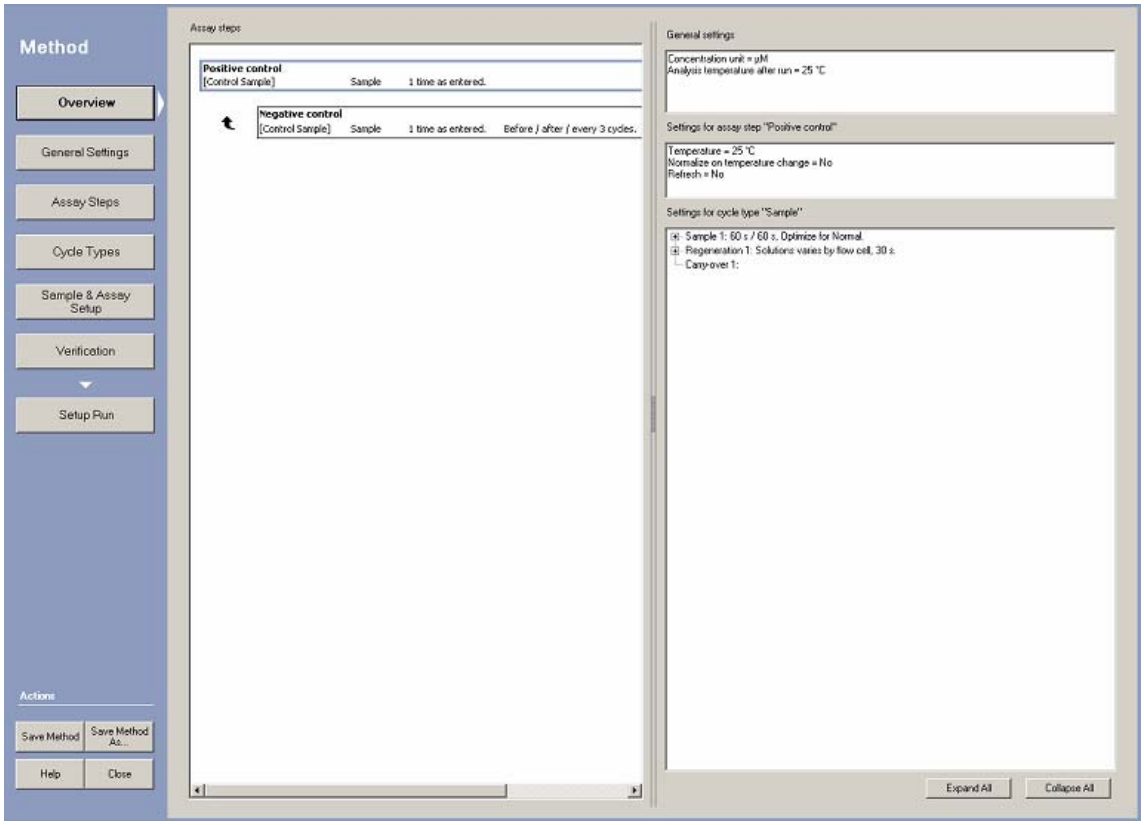
特異的な相互作用は、リガンド固定化スポットのセンサーグラムからリファレンススポットのセンサーグラムを差し引いて判断する。

4-1. コントロールサンプルを用いた結合の確認

4-1-1.　結合確認測定の実行

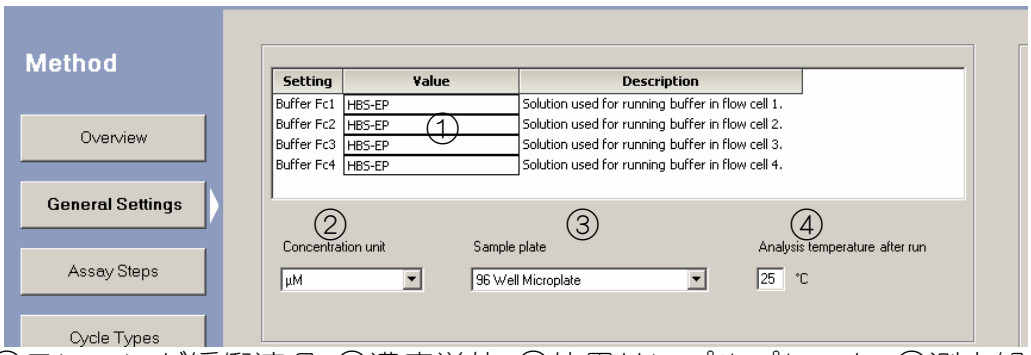
ポジティブコントロールを添加して結合の有無を確認する。
ナビゲーションパネルの **New Method** をクリックし、
Biacore Methods / Assay Development /Assay Conditions/ Binding conditions を選択し **OK** をクリックする。

↓



General Settings をクリックする。

↓



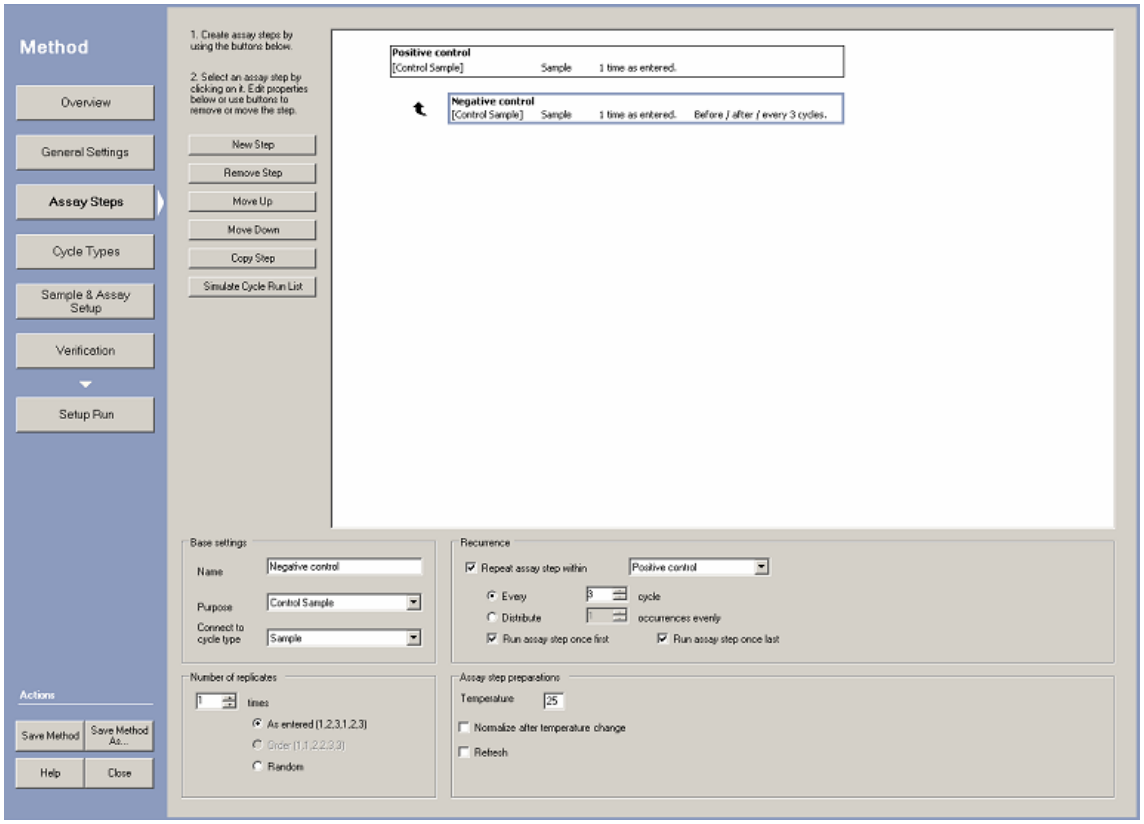
①ランニング緩衝液名 ②濃度単位 ③使用サンプルプレート ④測定終了後の

温度設定を行う。

↓

設定後 **Assay Steps** をクリックする。

↓

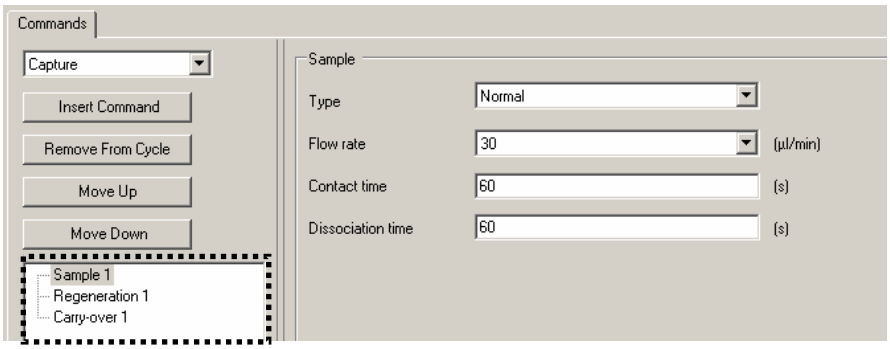


ネガティブコントロールを測定しない場合は Negative control ステップを選択し **Remove Step** をクリックする。

↓

Cycle Types をクリックする。

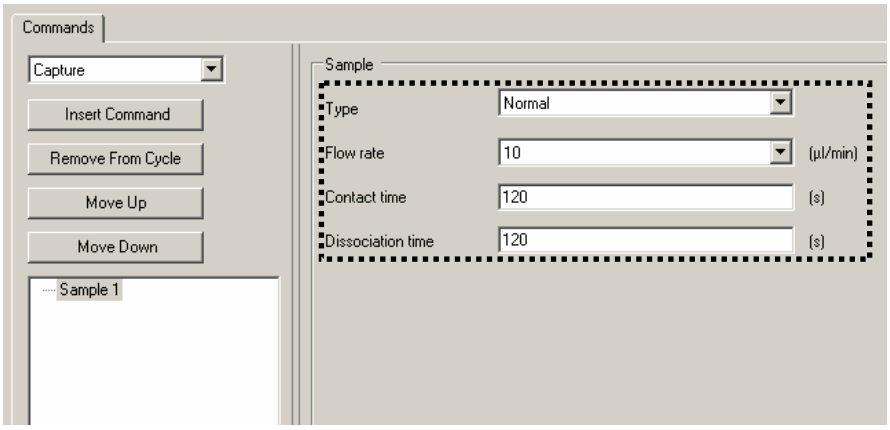
↓



Commands タブ内の Regeneration1、Carry-over 1 をそれぞれ選択し **Remove From Cycle** ボタンをクリックする。

↓

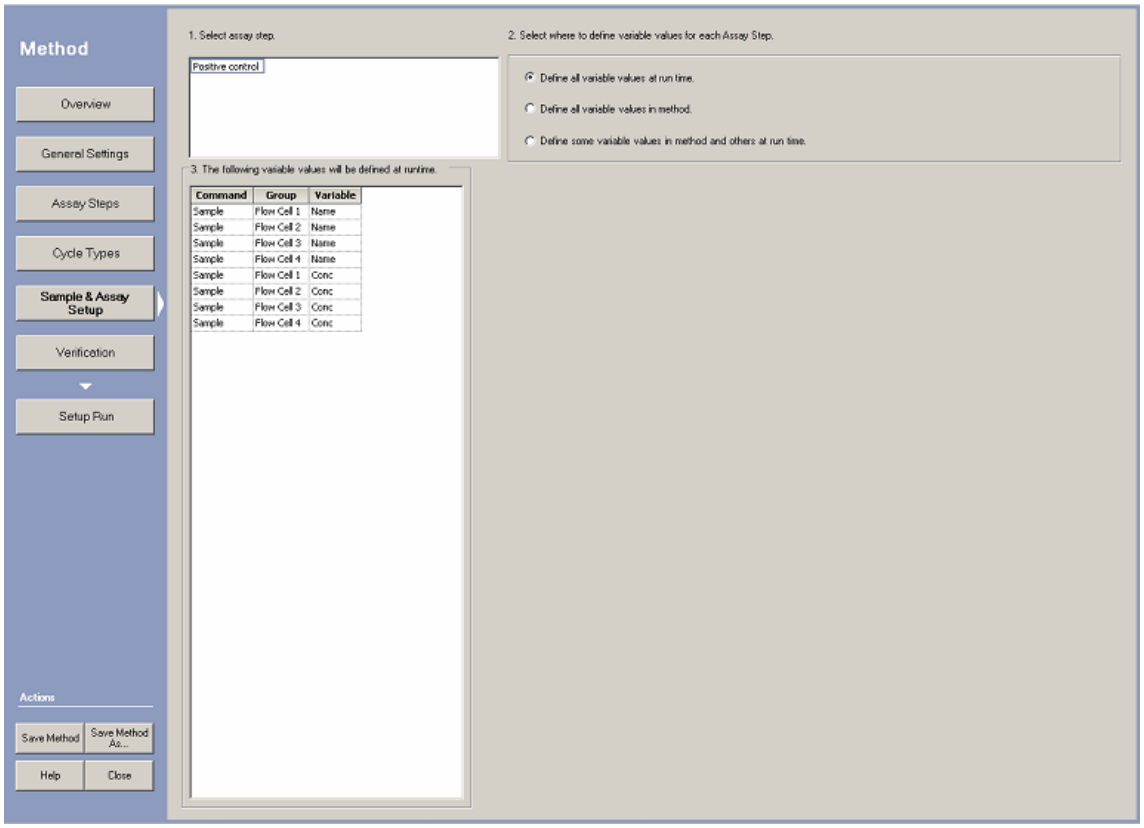
アナライトの測定条件を入力する。



Type（添加モードの選択）　　: Normal
Flow rate（流速の選択）　　: 10µl/min
Contact time（添加時間）　　: 120 (s)
Dissociation time（解離時間）: 120 (s)

Sample & Assay Setup をクリックする。

↓

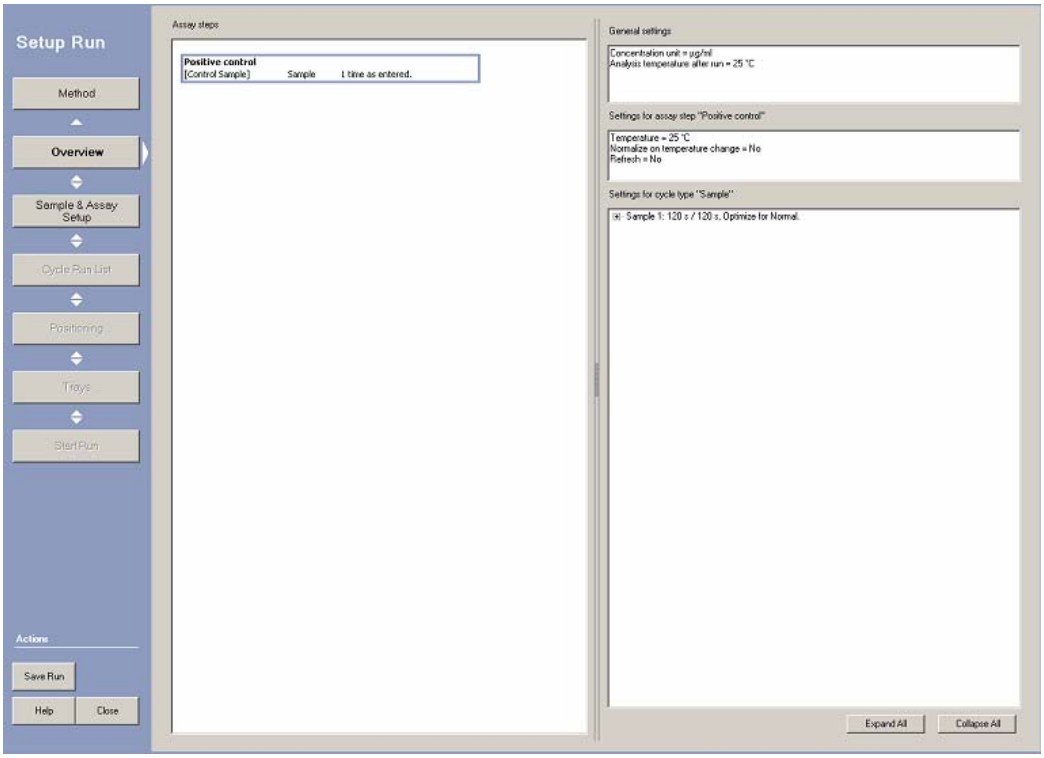


↓

Verification をクリックする。

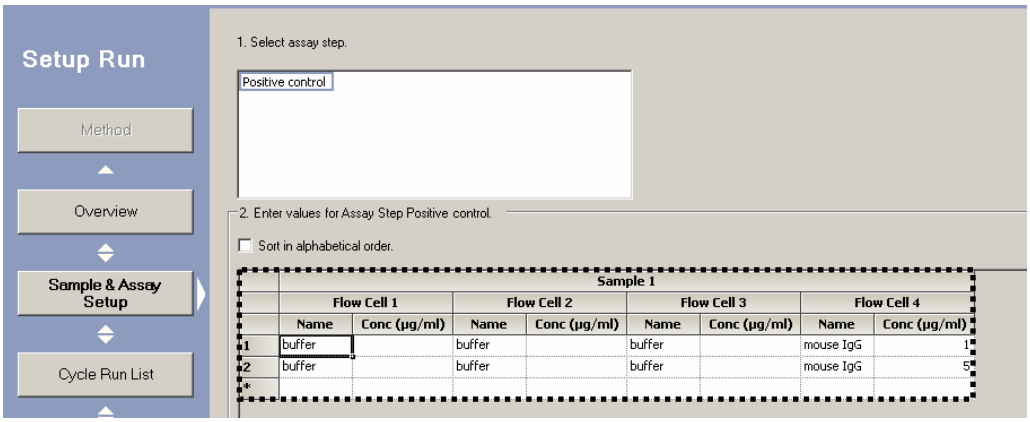
↓

Setup Run をクリックする。



Sample & Assay Setup をクリックする。

↓



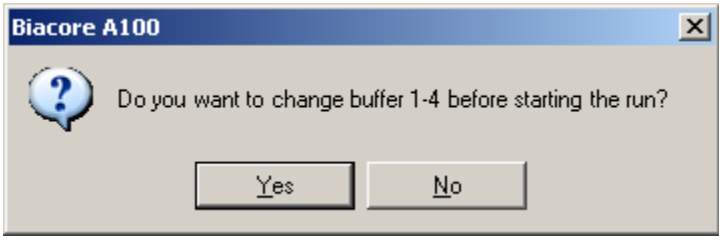
サンプル情報を入力する。濃度依存性を確認する場合は 2 濃度入力する。
使用しないフローセルには ”buffer” と入力する。

↓

Cycle Run List をクリックする。

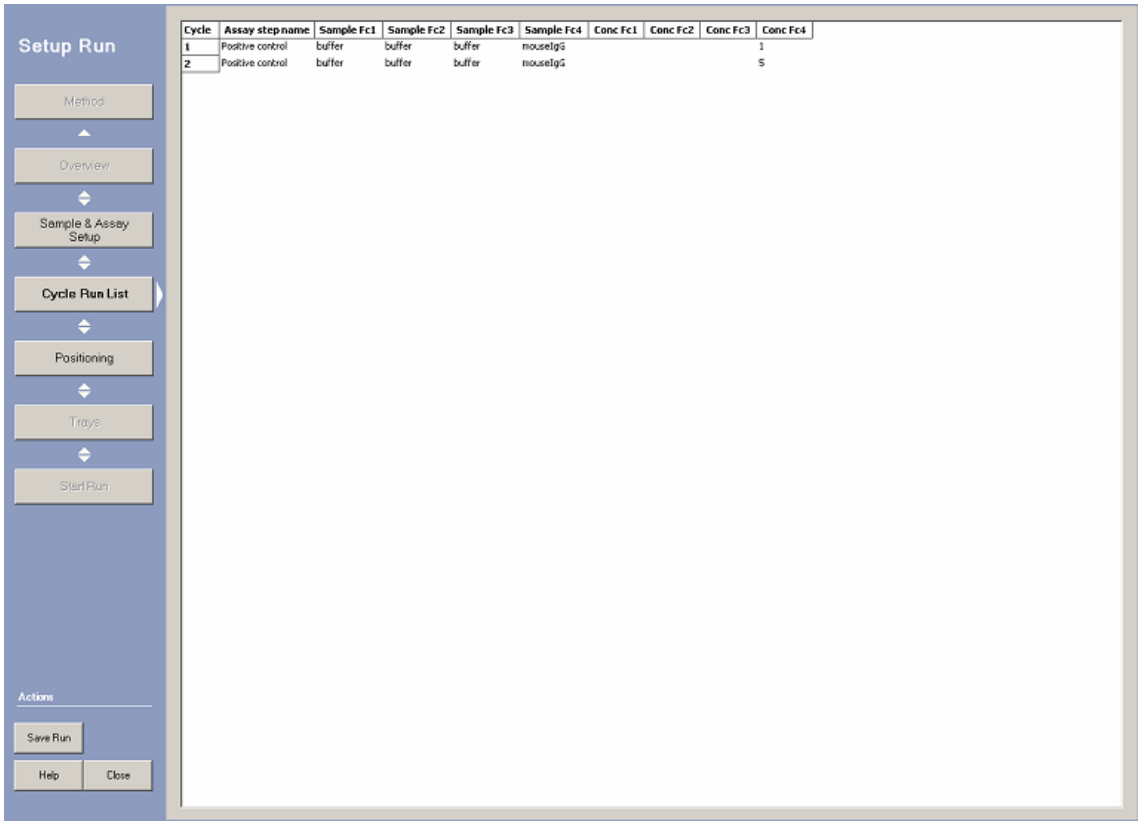
↓

↓



特にランニング緩衝液の交換が必要でない場合は **No** をクリックする。

↓



Positioning→**Trays**→**Start Run** の順で設定を進め、測定を開始する。

4-1-2.　結合の有無の評価

結果の評価は解析専用ソフトウェア Biacore A100 Evaluation を用いて行う。

コントロールソフトウェアで取得したデータを選択し、ナビゲーションパネルの **Open** をクリックする。

↓

Assay Development / Assay Conditions / Binding conditions を選択し **OK** をクリックする。

↓

解析の概要を記したウィンドウが表示される。確認の後、**Close** をクリックする。

↓

Settings ウィンドウが表示され評価可能なフローセル・スポットが色分けされ表示される。
確認後 **Next >**をクリックする。

↓

各スポットの設定と、評価可能なセンサーグラムの一覧が表示される。必要に応じて解析するセンサーグラムを選択する。

↓

Tables をクリックする。

↓

Quality Control をクリックする。

↓

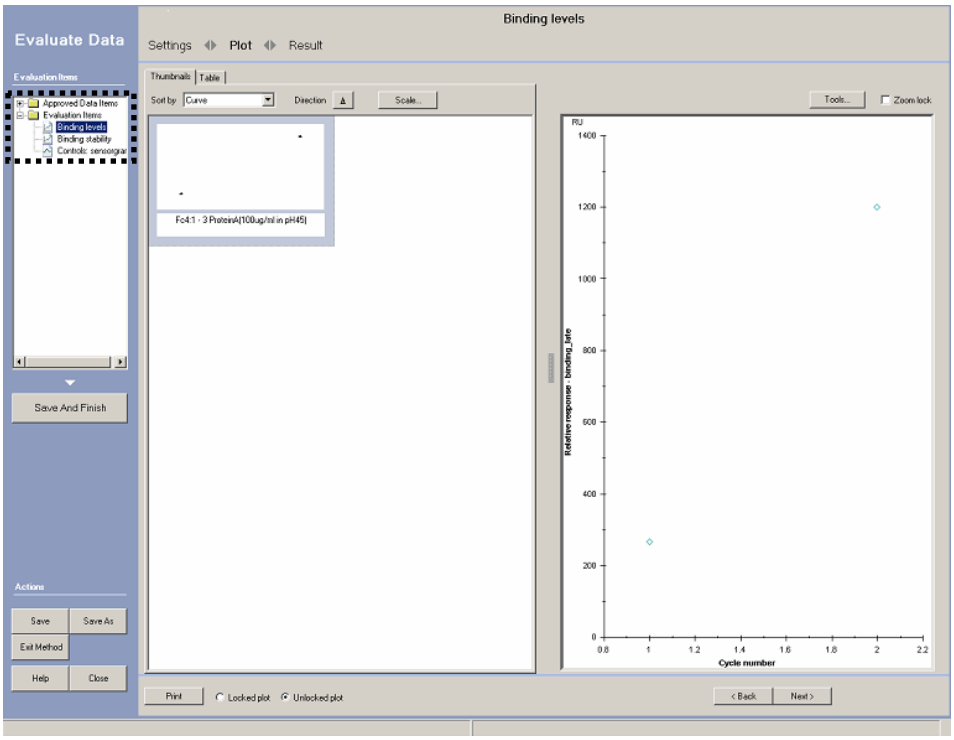
Save And Continue をクリックしデータを保存する。

↓

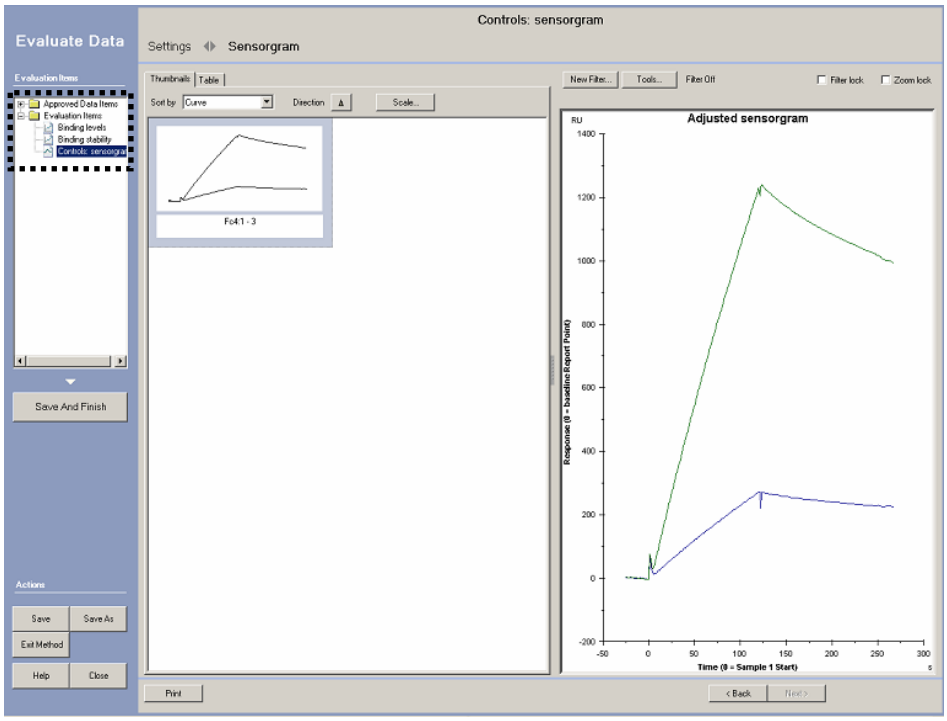
再度 Notebook の解析プロトコルを確認し、**Close** をクリックする。

↓

ナビゲーションパネルの Evaluation Items 内の Binding levels が選択され、結合レスポンスがプロットされる。評価に使用するプロットを選択する。



Controls:sensorgram でセンサーグラムを確認する。



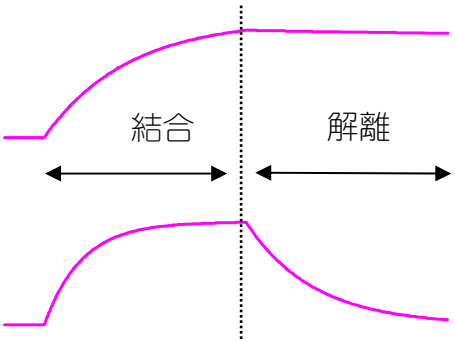
↓

Save And Finish をクリックしデータを保存する。

＜結果の評価＞
固定化リガンドの活性チェックのポイントは下記の 2 点である。

① 濃度依存的なセンサーグラムが得られているか。
② センサーグラムの形状はどうか。再生の必要はあるか。
（再生：結合したアナライトを強制的に解離させる操作。55 ページの 4-2 参照）

●解離が遅い
→再生が必要

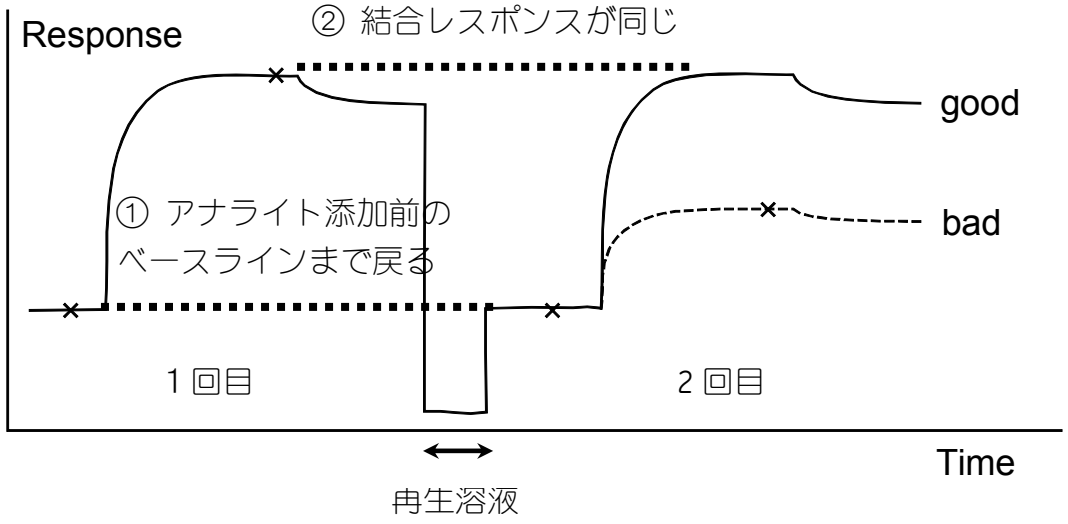


●速やかに解離する。
→再生の必要なし

4-2. 再生条件の検討

結合したアナライトを強制的に解離させる操作を再生(Regeneration)という。
再生は塩、酸、アルカリ溶液等をアナライト結合表面に 30 秒～1 分間添加することで行う。再生条件（どの試薬で何秒間、何回添加するか）は、分子間ごとに異なるためその都度検討が必要となる。理想的な再生は以下の条件を満たす。

リガンドの活性が失われない
アナライトが完全に解離する
● リガンドがセンサーチップ表面から遊離しない



補足 9　再生溶液の例

再生溶液は通常以下のようなものが使用される。

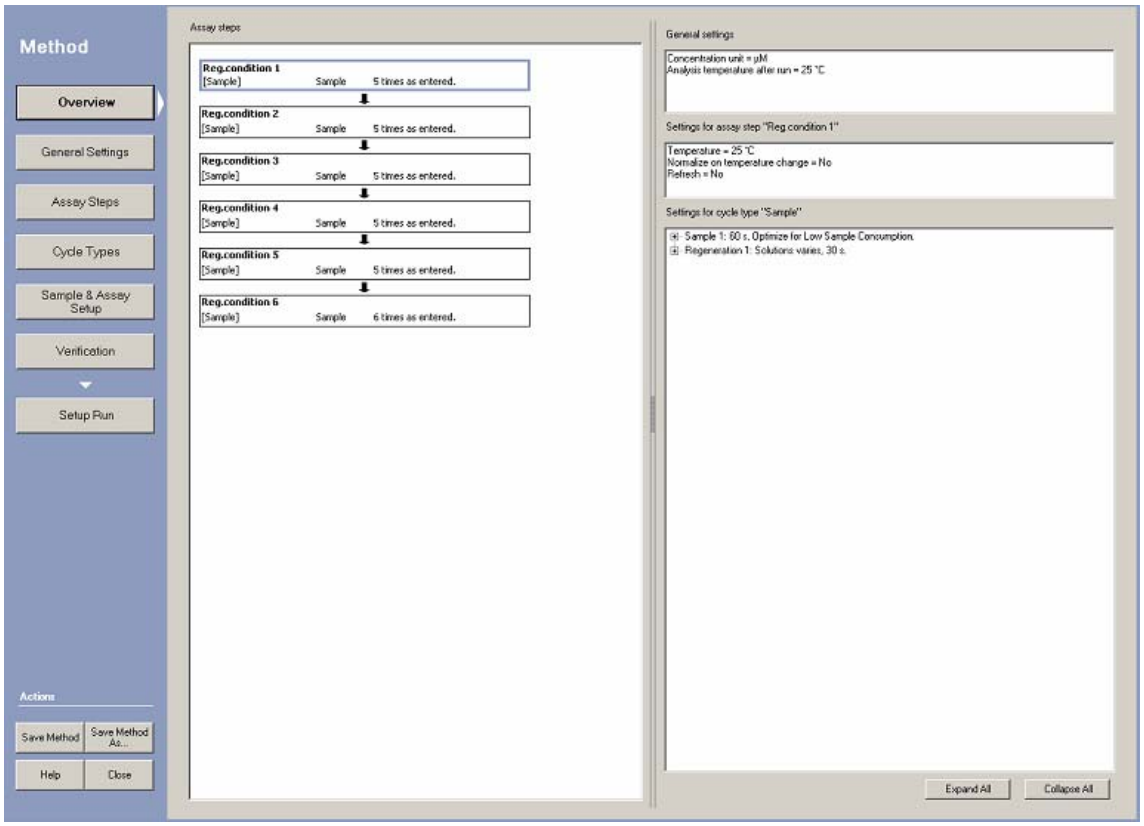
再生溶液の例

試薬	濃度あるいは pH
（塩）	
NaCl	< 2 M
（酸性条件）	
10 mM Gly-HCl	> pH 1.5
HCl	< 100 mM
Phosphoric acid	< 100 mM
Formic acid	< 20 %
（アルカリ条件）	
10 mM Gly-NaOH	< pH 12
NaOH	< 100 mM
Ethanolamine	< 100 mM
Ethanolamine-HCl	< 1 M
（キレート剤）－多価カチオン依存性反応の場合	
EDTA	< 0.35 M
（界面活性剤）	
Surfactant P-20 (Tween 20)	< 5 %
Triton X-100	< 5 %
SDS	< 0.5 %
Octylglucoside	< 40 mM
（有機溶媒）	
Acetonitrile	< 20%
DMSO	< 50%
Ethyleneglycol in HBS buffer	< 50%
Ethanol	< 20%
Formamide	< 40%
（変性剤）	
Guanidine-HCl	< 5M
Urea	< 8M

4-2-1.　再生条件検討の実行

アナライトの添加□再生・・のサイクルを各再生条件あたり 5 回繰り返す。
結合レスポンスの推移を評価し、再生条件を決定する。

ナビゲーションパネルの **New Method** をクリックし、
Biacore Methods / Assay Development / Regeneration Scouting / Regeneration scouting を選択し **OK** をクリックする。



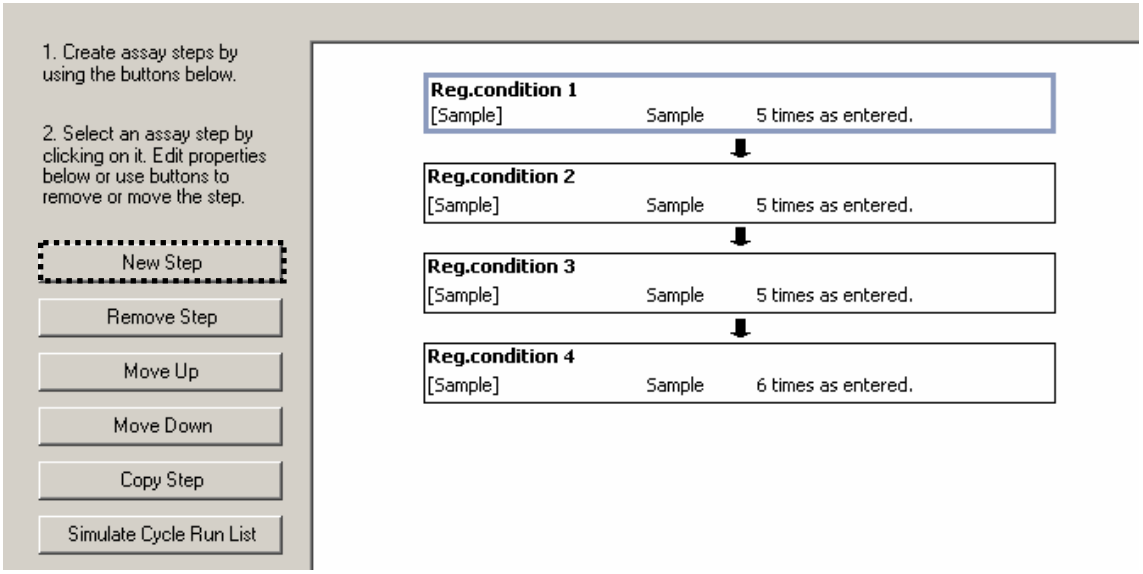
General Settings をクリックする。

↓

使用するランニング緩衝液名、濃度単位、使用プレート、温度を設定し、**Assay Steps** をクリックする。

↓

検討する再生条件数に応じて設定を変更する。

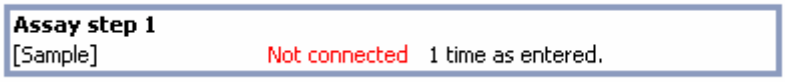

1. Create assay steps by using the buttons below.
2. Select an assay step by clicking on it. Edit properties below or use buttons to remove or move the step.
New Step
Remove Step
Move Up
Move Down
Copy Step
Simulate Cycle Run List
Reg.condition 1
[Sample] Sample 5 times as entered.
Reg.condition 2
[Sample] Sample 5 times as entered.
Reg.condition 3
[Sample] Sample 5 times as entered.
Reg.condition 4
[Sample] Sample 6 times as entered.

デフォルトは 6 種類。ステップを削除する場合はそのステップを選択して **Remove Step** をクリックする。再生条件表示（デフォルトは"**Reg.condition1～**"を変更する場合にはステップを選択し、Base setting の Name を変更する。

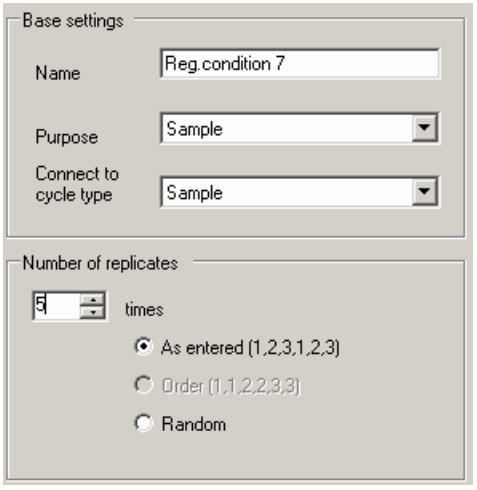
＜ステップを追加する場合＞

New Step をクリックする。

↓



Base settings と Number of replicates を以下のように設定する。

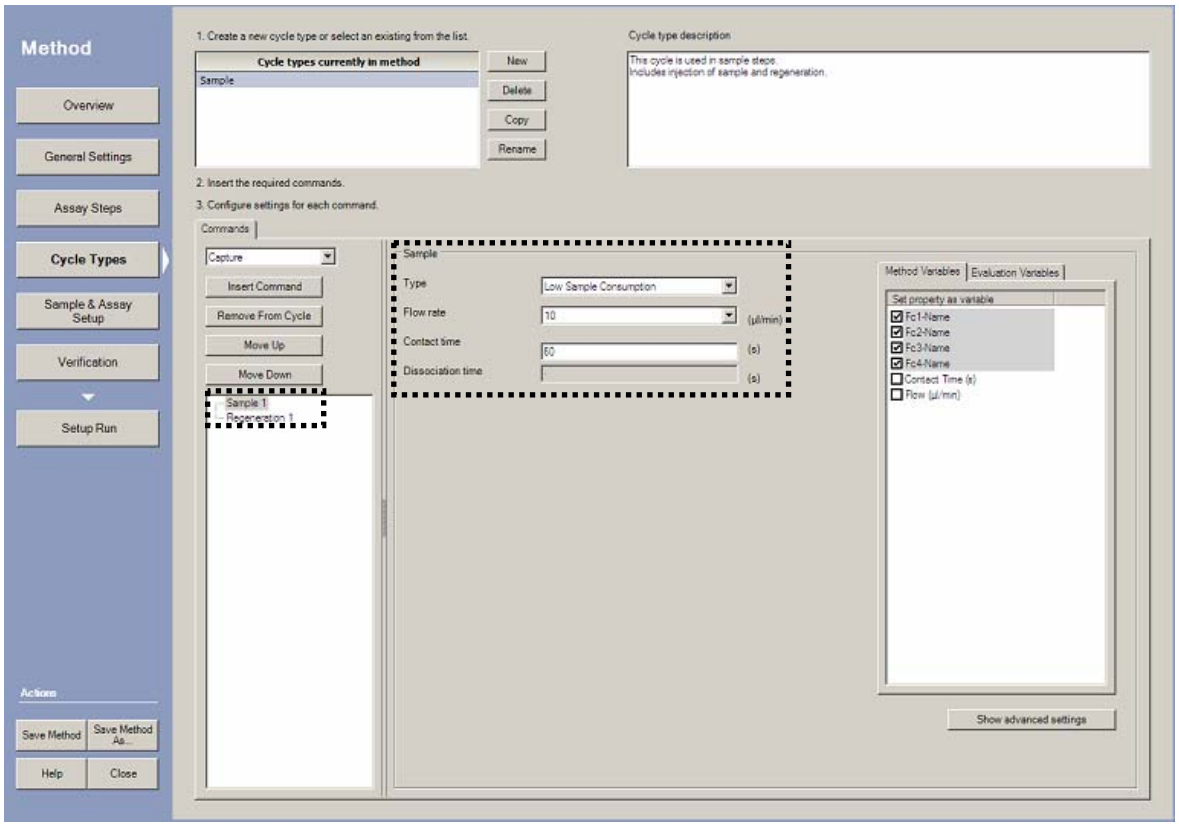


↓

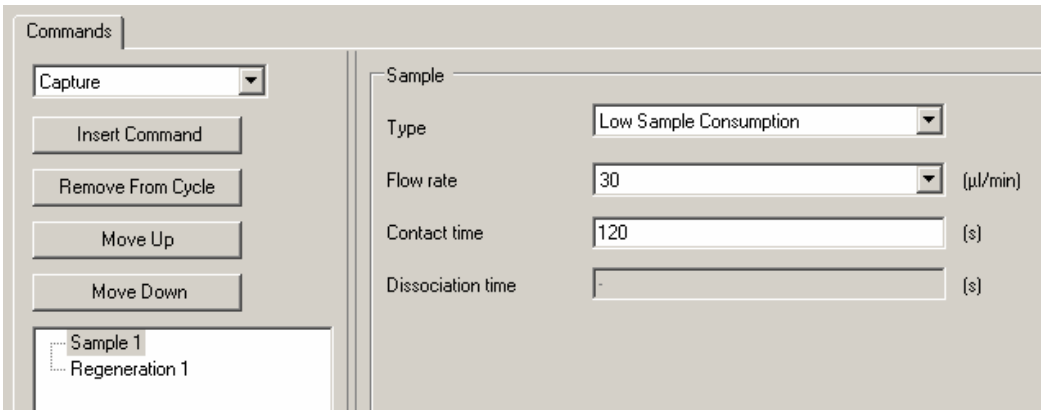
Cycle Types をクリックする。

↓

アナライト、再生溶液の添加条件を設定する。



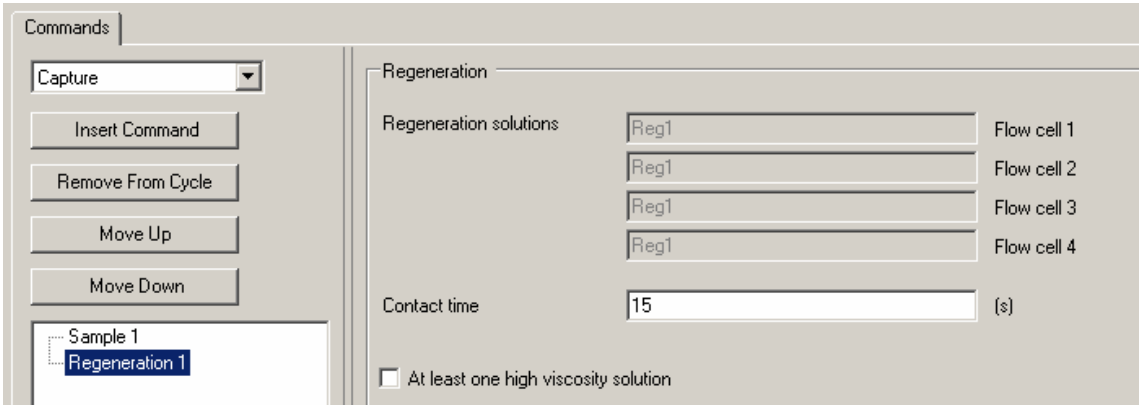
Commands タブ内の Sample1 を選択し、Sample 欄でコントロールサンプルの添加条件を設定する。



Type（添加モードの選択）　：Low Sample Consumption
Flow rate（流速の選択）　：30µl/min
Contact time（添加時間）　：120 (s)

↓

Commands タブ内の Regeneration1 を選択する。



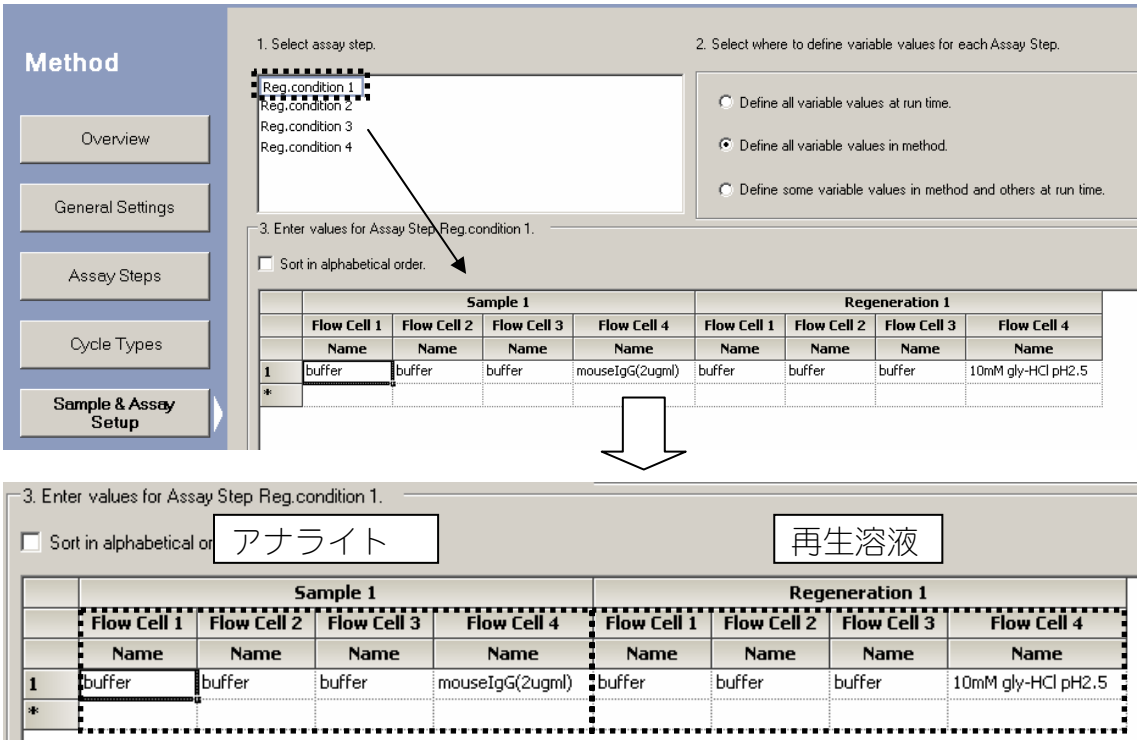
Regeneration 欄の Contact time に再生溶液の添加時間を秒数で入力する。通常は 60 秒以内で設定する。

↓

Sample & Assay Setup をクリックする。

↓

各コンディションを選択しサンプル設定を行う。検討に使用しないフローセルには “buffer” と入力する。

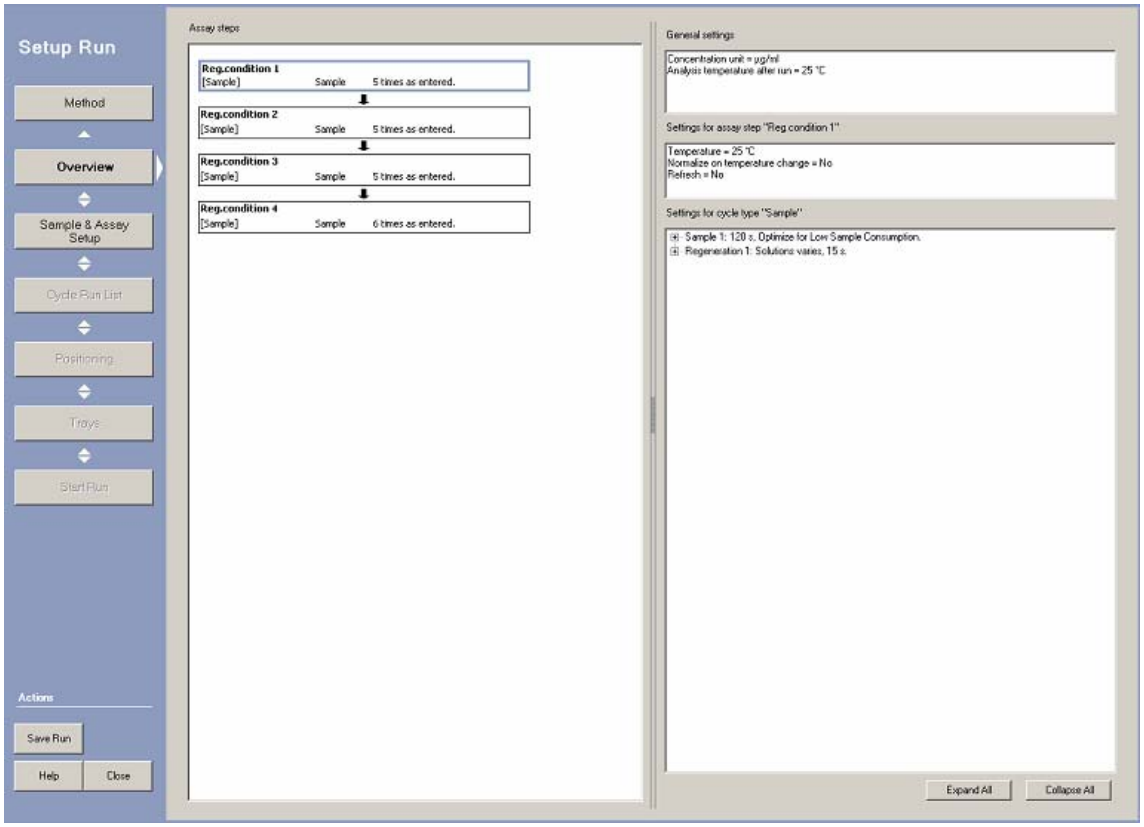


すべてのコンディションについて入力したら **Verification** をクリックする。

↓

Setup Run をクリックする。

↓



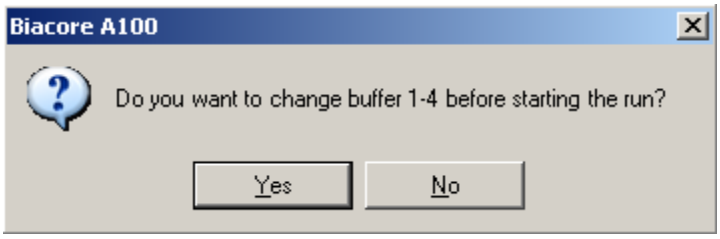
Sample & Assay Setup をクリックする。

↓

↓

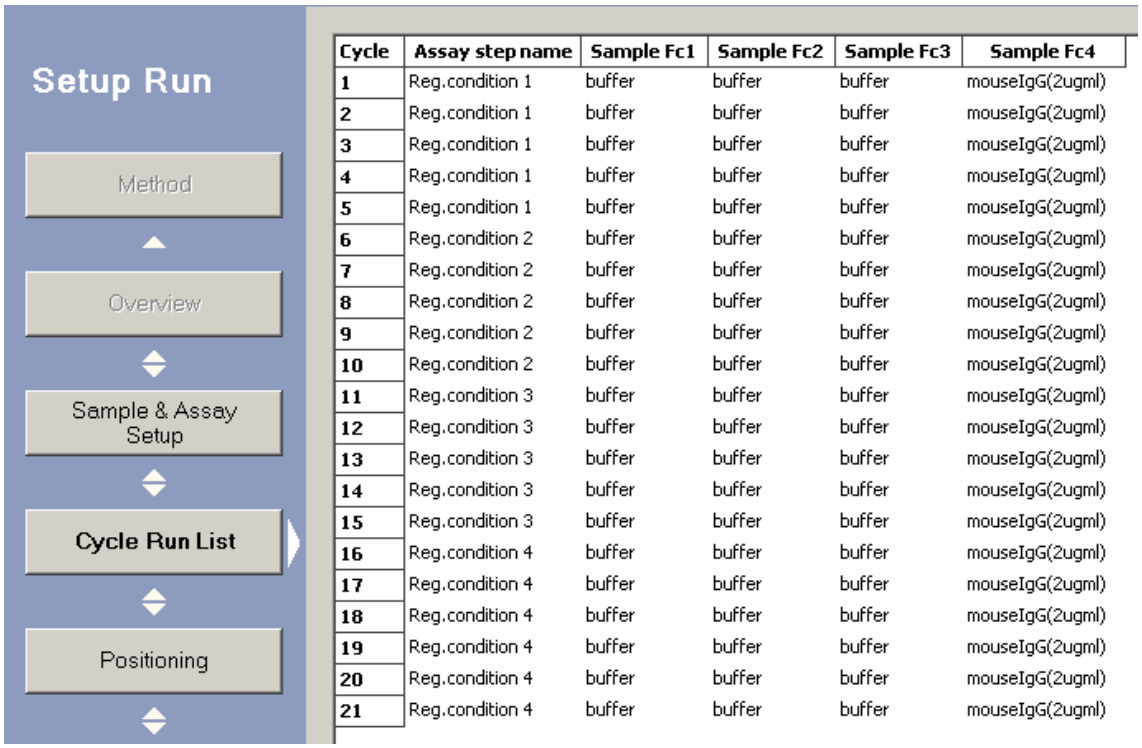
Cycle Run List をクリックする。

↓



特にランニング緩衝液の交換が必要でない場合は **No** をクリックする。

↓



Cycle	Assay step name	Sample Fc1	Sample Fc2	Sample Fc3	Sample Fc4
1	Reg.condition 1	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
2	Reg.condition 1	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
3	Reg.condition 1	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
4	Reg.condition 1	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
5	Reg.condition 1	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
6	Reg.condition 2	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
7	Reg.condition 2	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
8	Reg.condition 2	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
9	Reg.condition 2	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
10	Reg.condition 2	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
11	Reg.condition 3	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
12	Reg.condition 3	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
13	Reg.condition 3	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
14	Reg.condition 3	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
15	Reg.condition 3	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
16	Reg.condition 4	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
17	Reg.condition 4	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
18	Reg.condition 4	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
19	Reg.condition 4	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
20	Reg.condition 4	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)
21	Reg.condition 4	buffer	buffer	buffer	mouseIgG(2ugml)

Positioning→Trays→Start Run の順で設定を進め、測定を開始する。

4-2-2.　再生条件の評価

結果の評価は Biacore A100 Evaluation を用いて行う。

コントロールソフトウェアで取得したデータを選択し、ナビゲーションパネルの **Open** をクリックする。
Assay Development / Regeneration Scouting / Regeneration scouting を選択し **OK** をクリックする。

↓

Notebook の解析プロトコルを確認し **Close** をクリックする。

↓

評価可能なフローセル・スポットが色分けされて表示される。
確認後 **Next >**をクリックする。

↓

各スポットの設定と、評価可能なセンサーグラムの一覧が表示される。必要に応じて解析するセンサーグラムを選択する。

↓

Tables をクリックする。

↓

Quality Control をクリックする。

↓

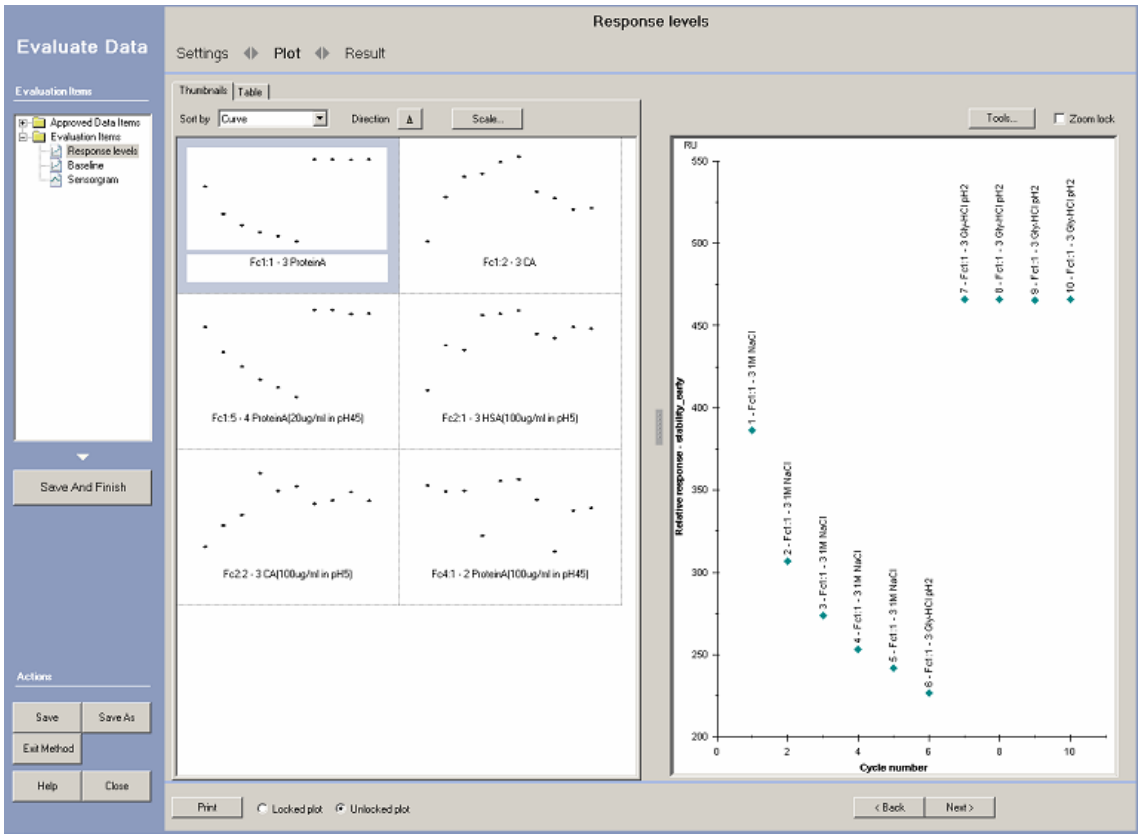
Save And Continue をクリックし保存する。

↓

再度 Notebook の解析プロトコルを確認し、**Close** をクリックする。

↓

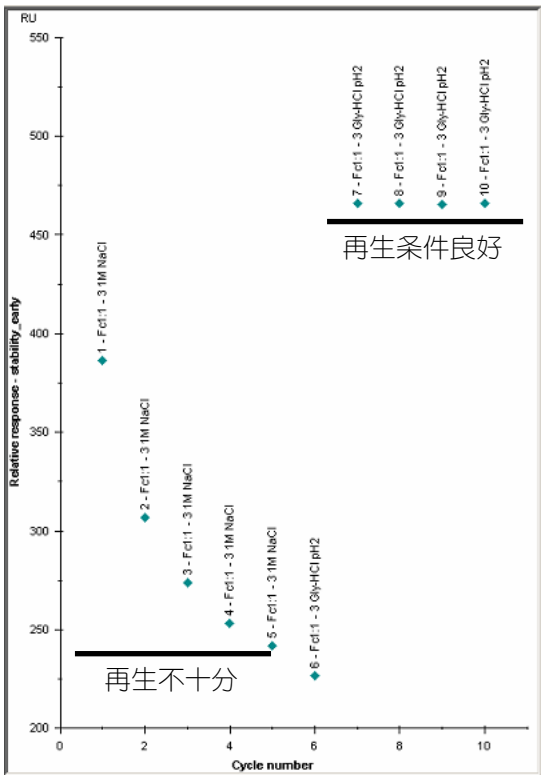
ナビゲーションパネルの Evaluation Items 内の Response levels が選択され結合レスポンスがプロットされる。
評価に使用するプロットを選択する。

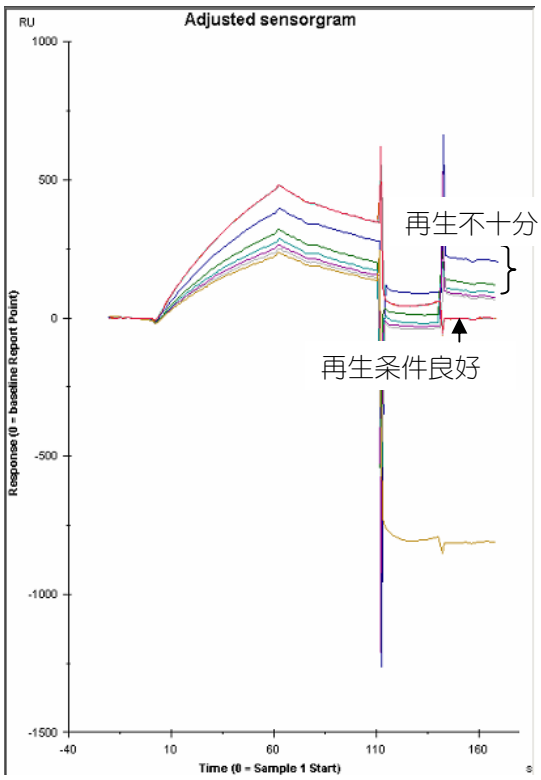


↓

Save And Finish をクリックしデータを保存する。

＜結果の評価＞
ナビゲーションパネルの Evaluation Items 内の Response levels をクリックする。
結合量がプロットされ、各点の上に再生溶液名が表示される。
また Sensorgram をクリックすると重ね書きが表示される。

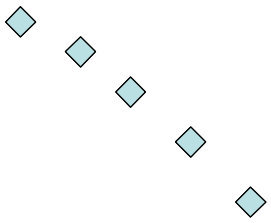




①再生条件が良好な場合

結合レスポンスは一定

②再生条件が不十分な場合
・ 結合したアナライトが完全に溶出されない。
・ リガンドの失活。



結合レスポンスは低下する

数種類の再生条件を検討した場合、上記□の結果が得られた再生溶液のうちで最もマイルドな条件を選択する。

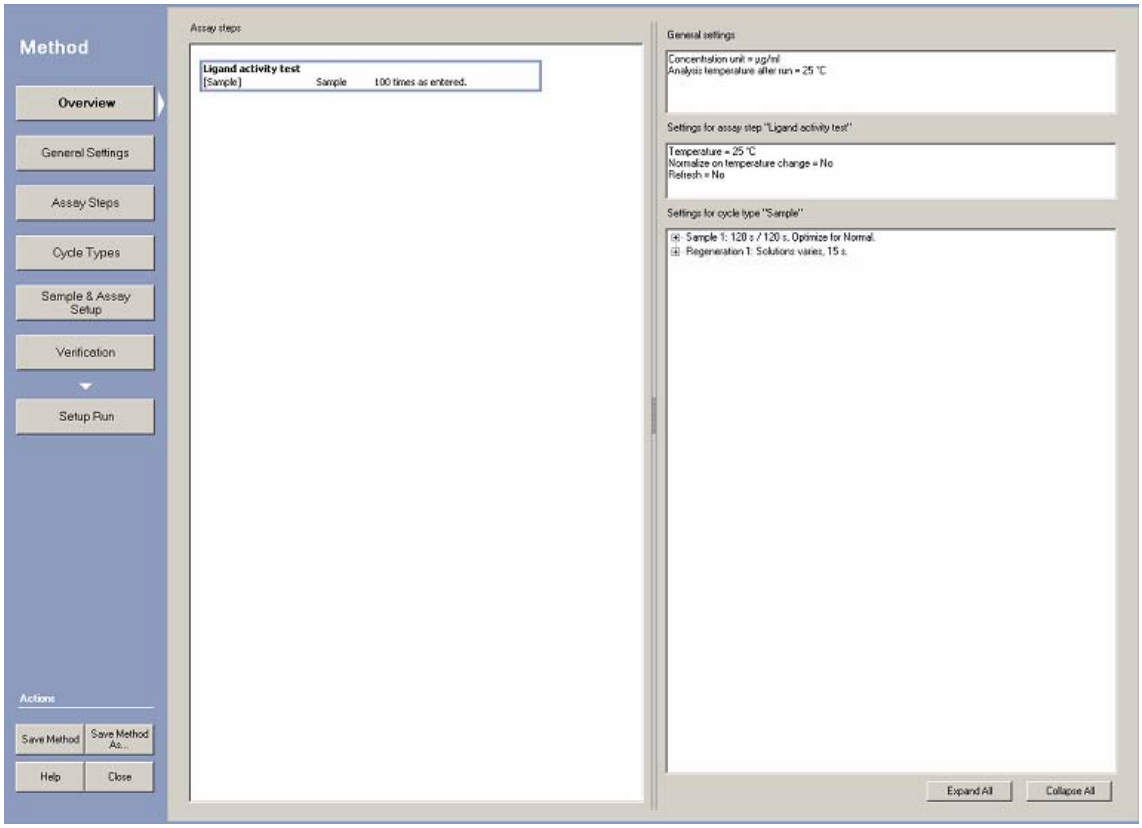
4-3. リガンドの耐久性試験

4-3-1. 繰り返し測定の実行

Regeneration Scouting で決定した再生条件を用いて繰り返し測定を行い、リガンドの耐久性を評価する。スクリーニング目的の場合には 1 回の測定で仕込むアナライト数を決めるためにも重要な評価である。

ナビゲーションパネルの **New Method** をクリックし、
Biacore Methods / Assay Development / Assay Conditions / Surface activity test を選択し **OK** をクリックする。

↓

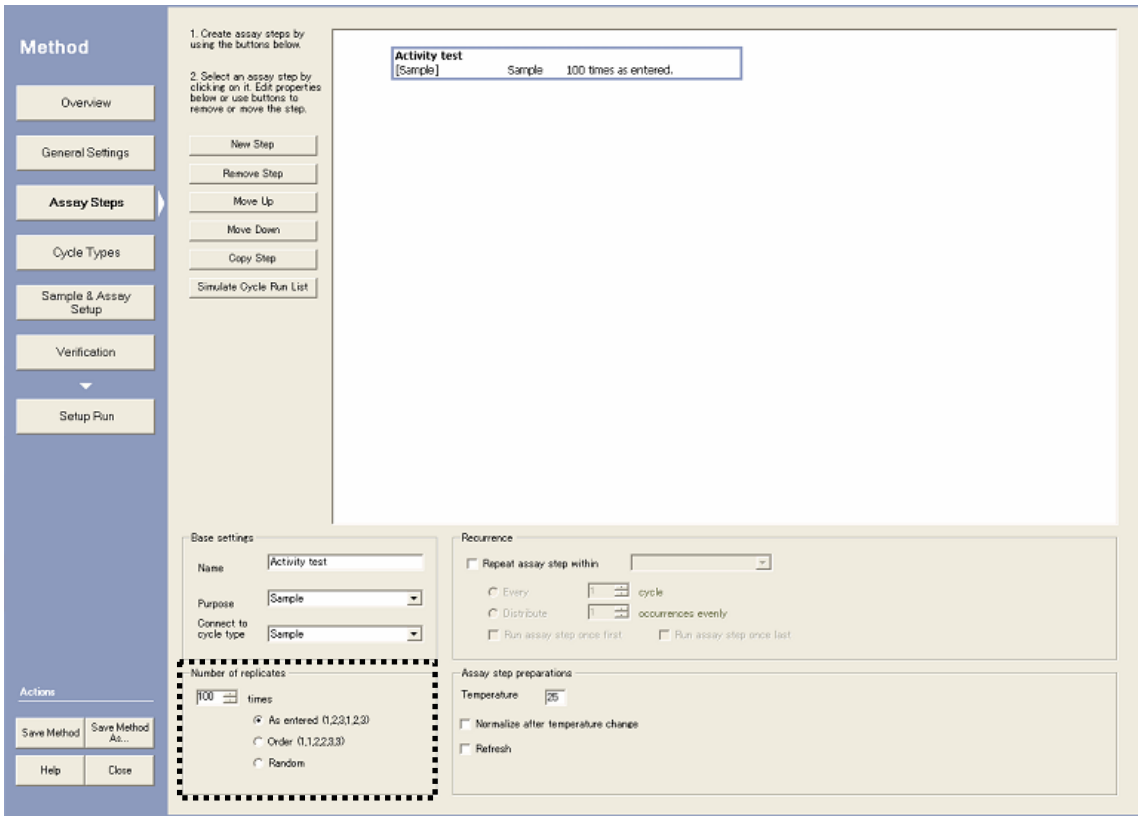


General Settings をクリックし設定を行う。

↓

Assay Steps をクリックする。

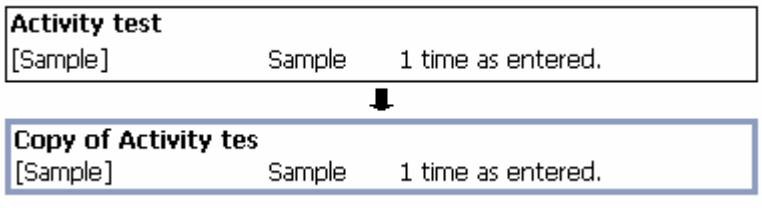
↓



Number of replicates で測定回数を設定する。最大 100 回まで入力可能である。

＜100 回以上評価する場合＞

Copy Step をクリックする。



Activity test がコピーされる。**Base setting** の欄で **Name** を”Activity test2”と入力し、**Number of replicates** で 100 を入力する。

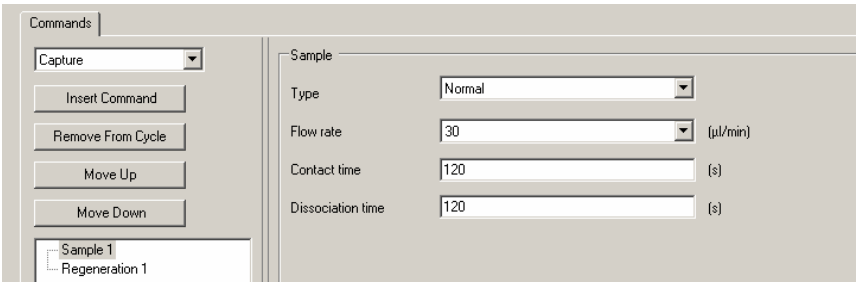
2 ステップで計 200 回の評価が可能になる。

↓

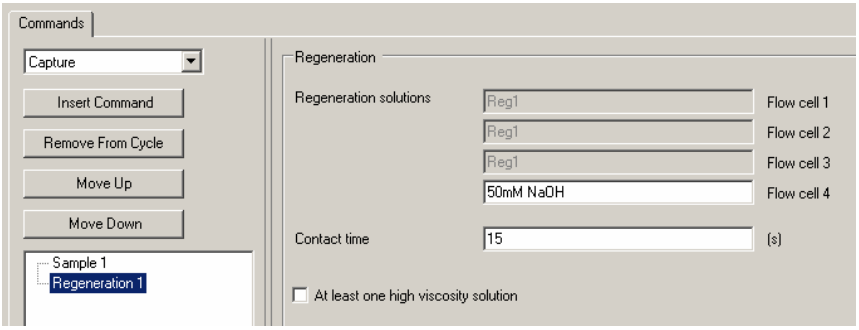
Cycle Types をクリックする。

↓

アナライト添加条件の設定を行う。



再生条件の設定を行う。



Sample & Assay Setup をクリックする。

↓

Verification をクリックする。

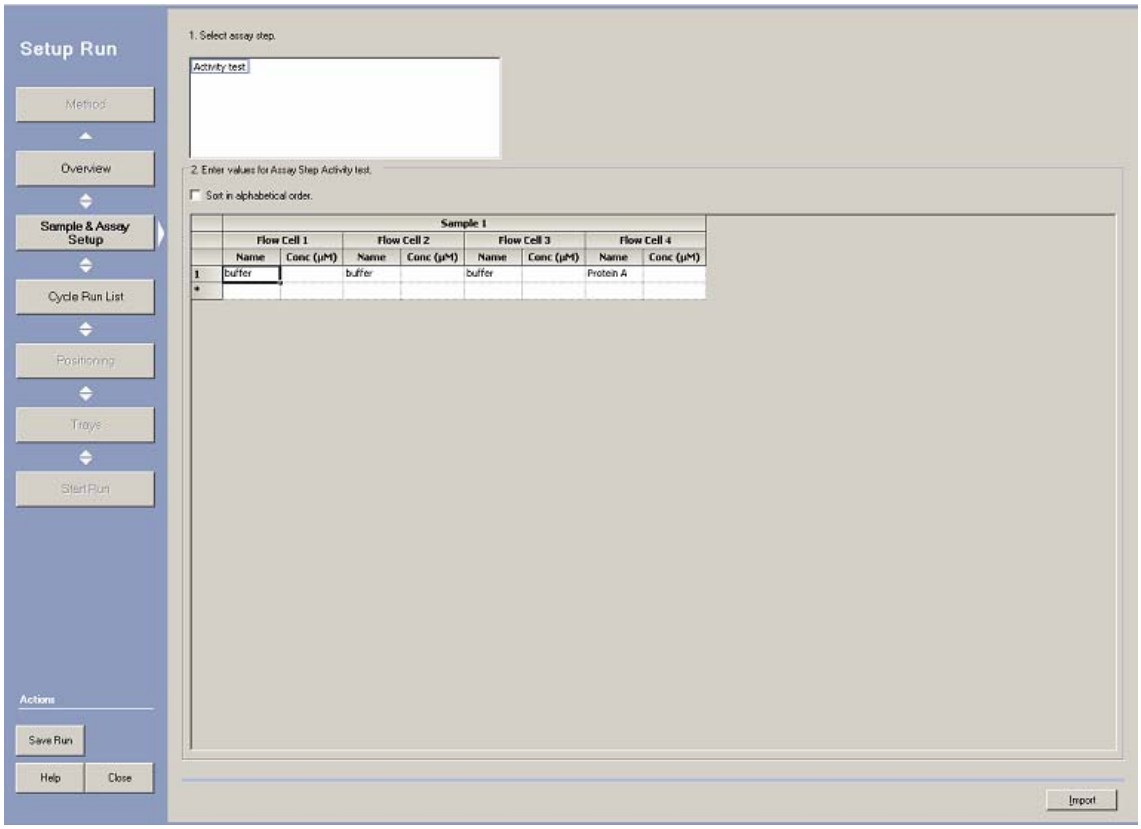
↓

Setup Run をクリックする。

↓

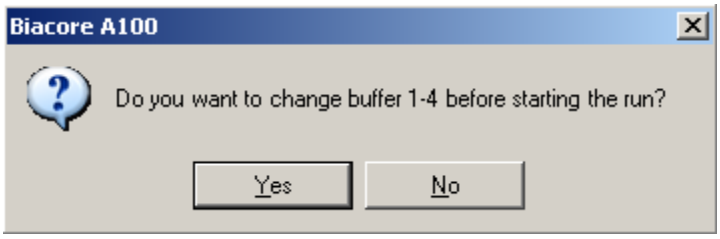
Sample & Assay Setup をクリックする。

↓



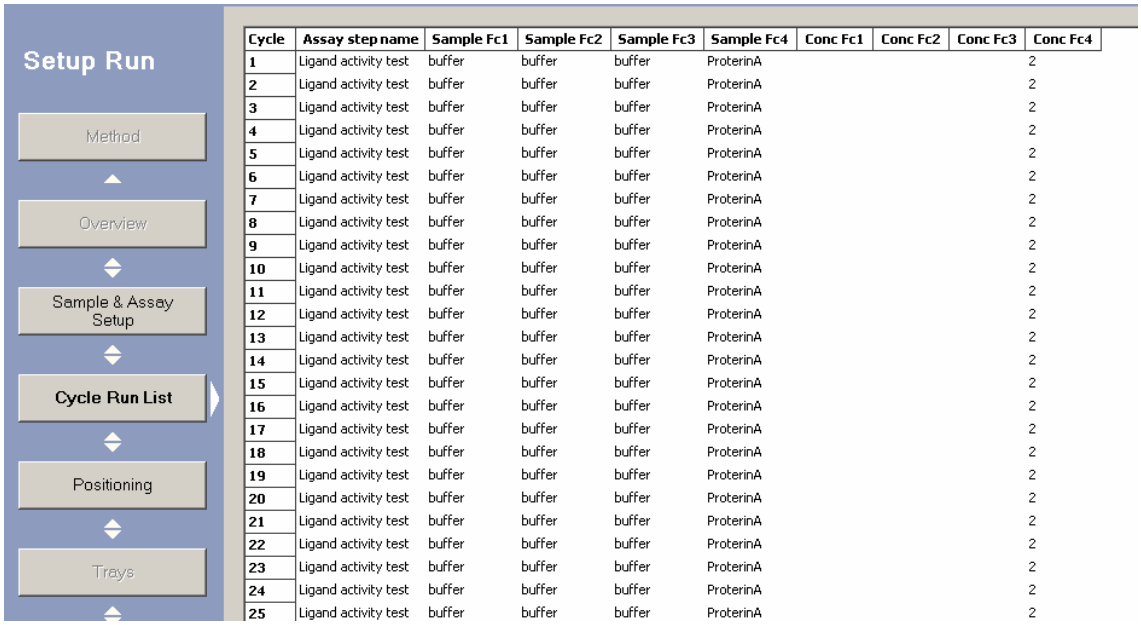
サンプル、再生溶液を入力し **Cycle Run List** をクリックする。

↓



特にランニング緩衝液の交換が必要ない場合は **No** をクリックする。

↓



Cycle	Assay step name	Sample Fc1	Sample Fc2	Sample Fc3	Sample Fc4	Conc Fc1	Conc Fc2	Conc Fc3	Conc Fc4
1	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
2	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
3	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
4	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
5	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
6	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
7	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
8	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
9	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
10	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
11	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
12	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
13	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
14	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
15	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
16	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
17	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
18	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
19	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
20	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
21	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
22	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
23	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
24	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2
25	Ligand activity test	buffer	buffer	buffer	ProterinA				2

↓

Positioning→**Trays**→**Start Run** の順で設定を進め、測定を開始する。

4-3-2. 繰り返し測定の結果の評価

結果の評価は Biacore A100 Evaluation を用いて行う。

コントロールソフトウェアで取得したデータを選択し、ナビゲーションパネルの **Open** をクリックする。
Assay Development / Assay Conditions / Surface activity test を選択し **OK** をクリックする。

↓

Notebook の解析プロトコルを確認し、**Close** をクリックする。

↓

Settings ウィンドウが表示され評価可能なフローセル・スポットが色分けされ表示される。
確認後 **Next >**をクリックする。

↓

各スポットの設定と、評価可能なセンサーグラムの一覧が表示される。必要に応じて解析するセンサーグラムを選択する。

↓

Tables をクリックする。

↓

Quality Control をクリックする。

↓

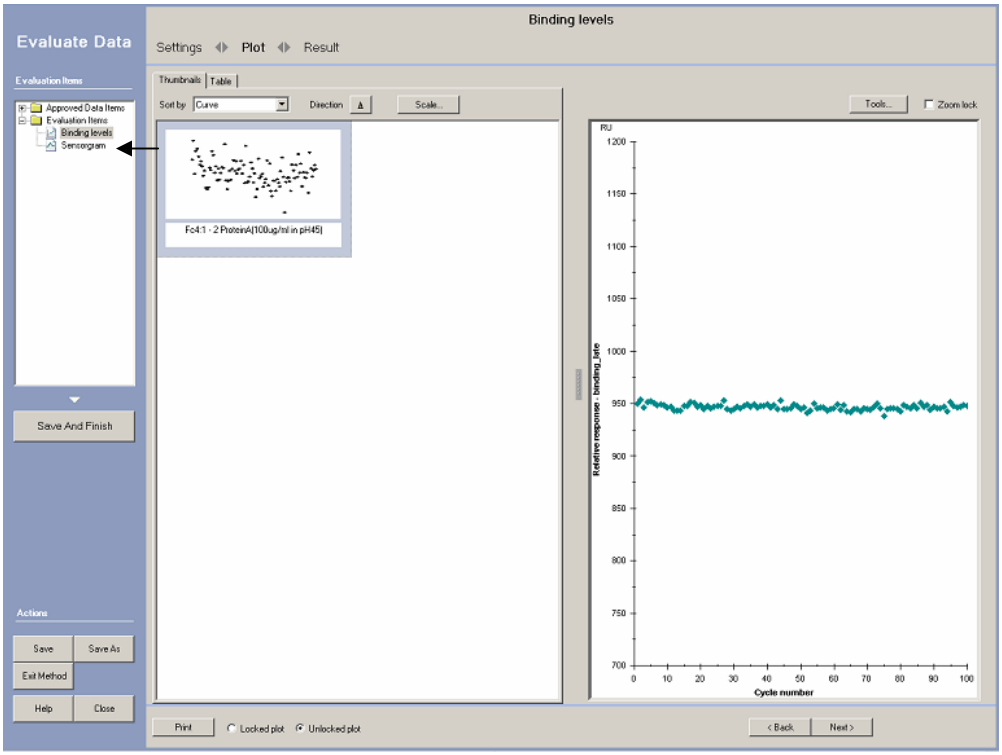
Save And Continue をクリックし保存する。

↓

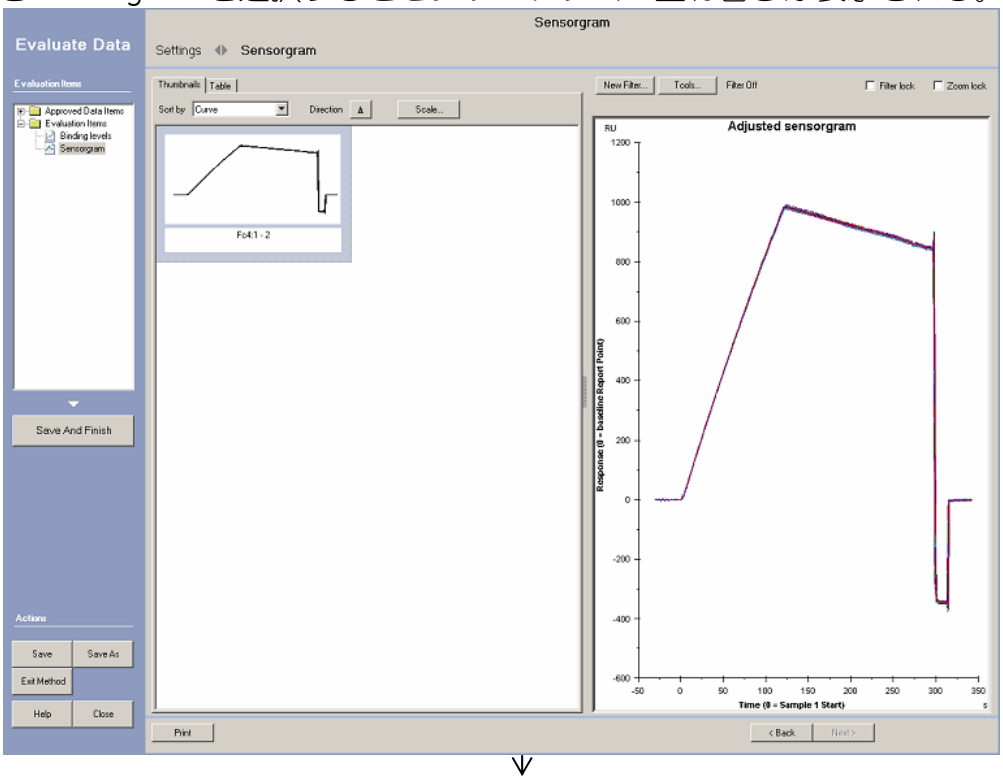
再度 Notebook が表示される。解析プロトコルを確認し、**Close** をクリックする。

↓

ナビゲーションパネルの Evaluation Items 内の Binding levels が選択され結合レスポンスがプロットされる。評価に使用するプロットを選択する。



また Sensorgram を選択するとセンサーグラムの重ね書きが表示される。



Save And Finish をクリックしデータを保存する。

＜結果の評価＞
繰り返し測定可能回数はリガンドの安定性と再生条件に依存する。
実験目的により評価の内容は異なる。

① スクリーニング
コントロールサンプルの結合レスポンスが確認できるレベルであればよい。経時的なレスポンス変化は補正により対処することができる。
補正はコントロールサンプルのレスポンス変化を関数にしてサンプルレスポンスを再計算する機能である。（174 ページの補足 14 を参照のこと）

② 反応速度定数算出
1 アナライトの定数を算出するのに 5 点以上濃度を振って測定するが、少なくともその間にリガンドの反応性が著しく変化しない条件が必要となる。

4-4.　測定の中止

測定を途中で中止する場合には **Menu bar→Run→Stop Run** をクリックする。
その測定サイクルまでのデータは保存され、次のサイクルに移行する前に測定がストップする。

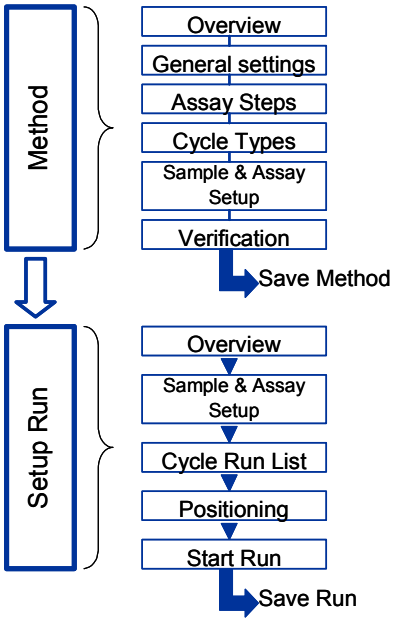
5. 測定プログラムの説明

すべての測定はメソッドビルダーという測定プログラム作成機能を用いて実施する。作成した測定プログラムを“メソッド”という。
測定目的ごとに予めテンプレートとなるメソッドが用意されているが、基本的に設定方法は全測定で共通である。

メソッドビルダーは大別して 2 ステップからなる。
Method ステップは測定条件や測定順序、サンプルの添加条件等を設定し、測定の基本骨格を作成する。作成したメソッドは保存して再度使用することができる。

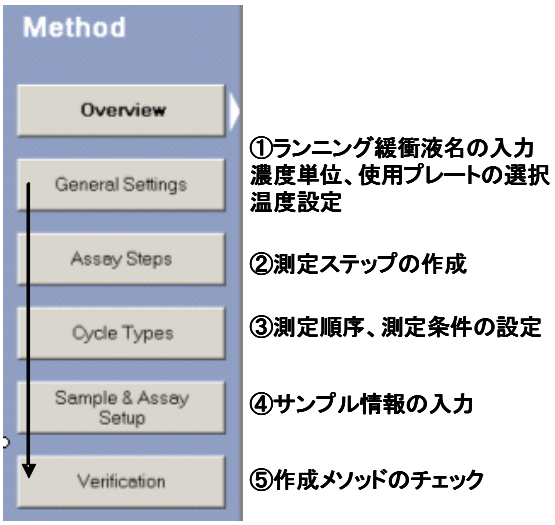
Setup Run ステップはサンプル情報の入力やサンプルの配置を行い、測定を開始する。

それぞれのステップ内で詳細設定を行う。

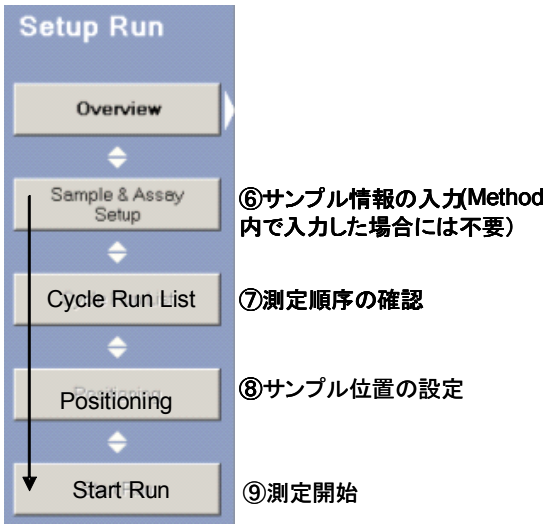


メソッドの作成はナビゲーションパネルのボタンを順次クリックしながら進める。基本的には順を追って進めていくが、変更があれば前ステップに戻って再設定することも可能である。

Method



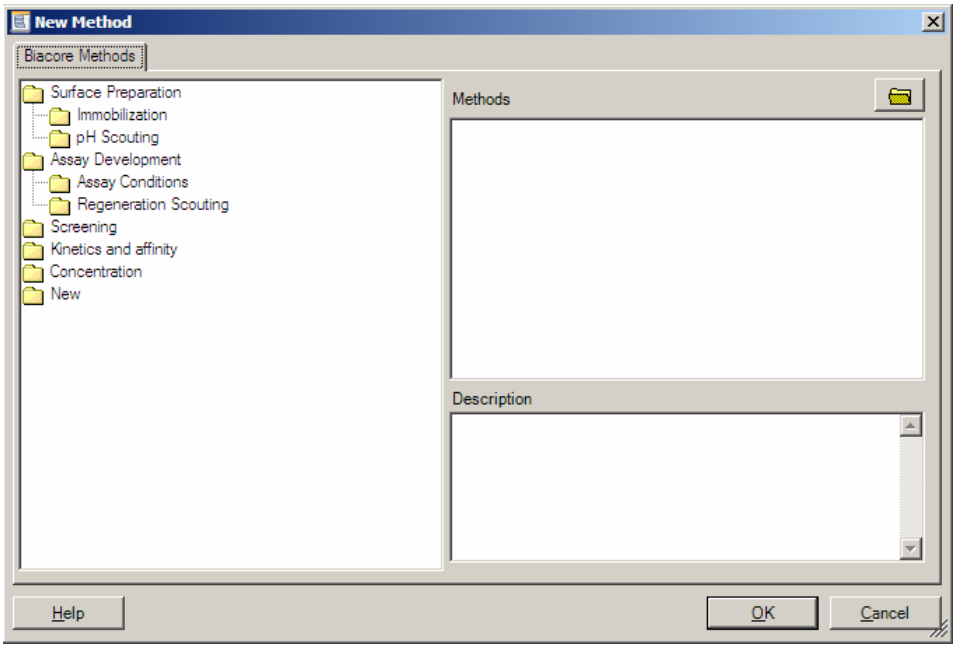
Setup Run



5-1.　メソッドの作成

ナビゲーションパネルの Action から **New Method** をクリックする。

↓



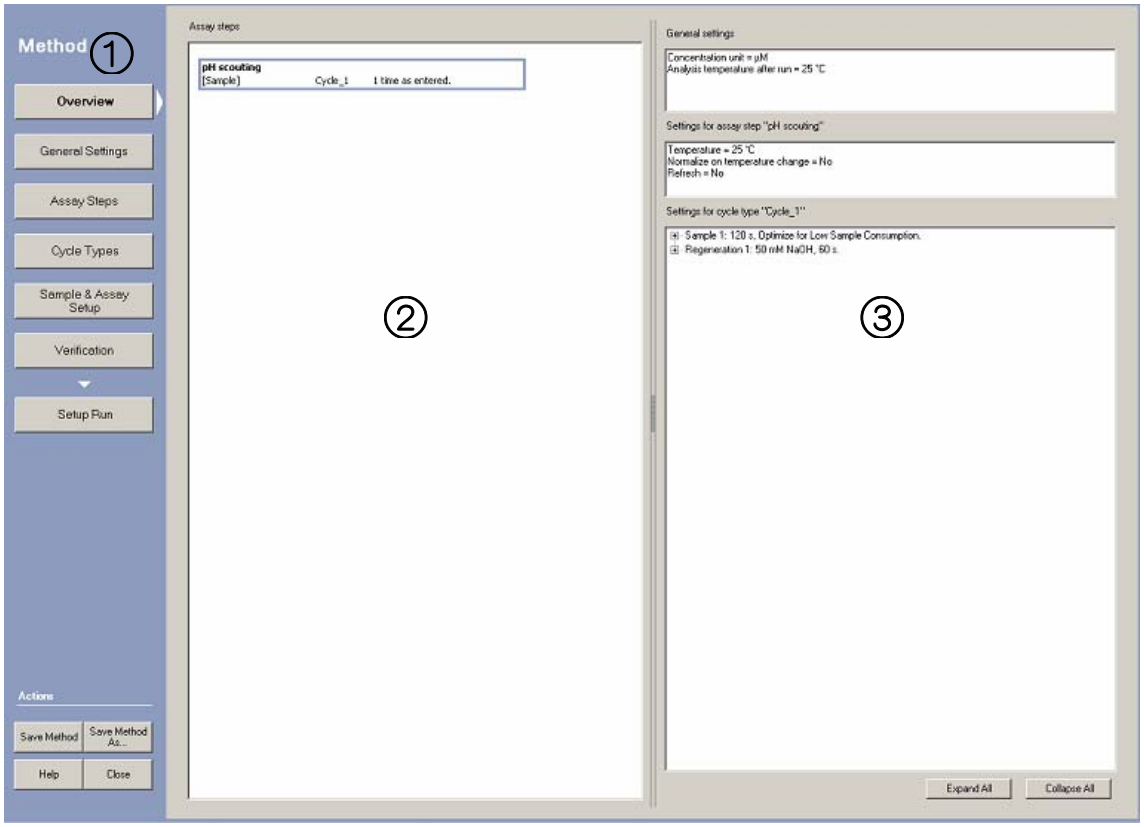
Surface Preparation　：固定化用メソッド
Assay Development　：測定条件検討用メソッド
Screening　：スクリーニング用メソッド
Kinetics and affinity　：反応速度定数・解離定数算出用メソッド
Concentration　：濃度測定用メソッド
New　：新規メソッド作成用

目的のメソッドを選択し **OK** をクリックする。

↓

測定目的により内容は異なるが設定手順は共通である。

基本画面

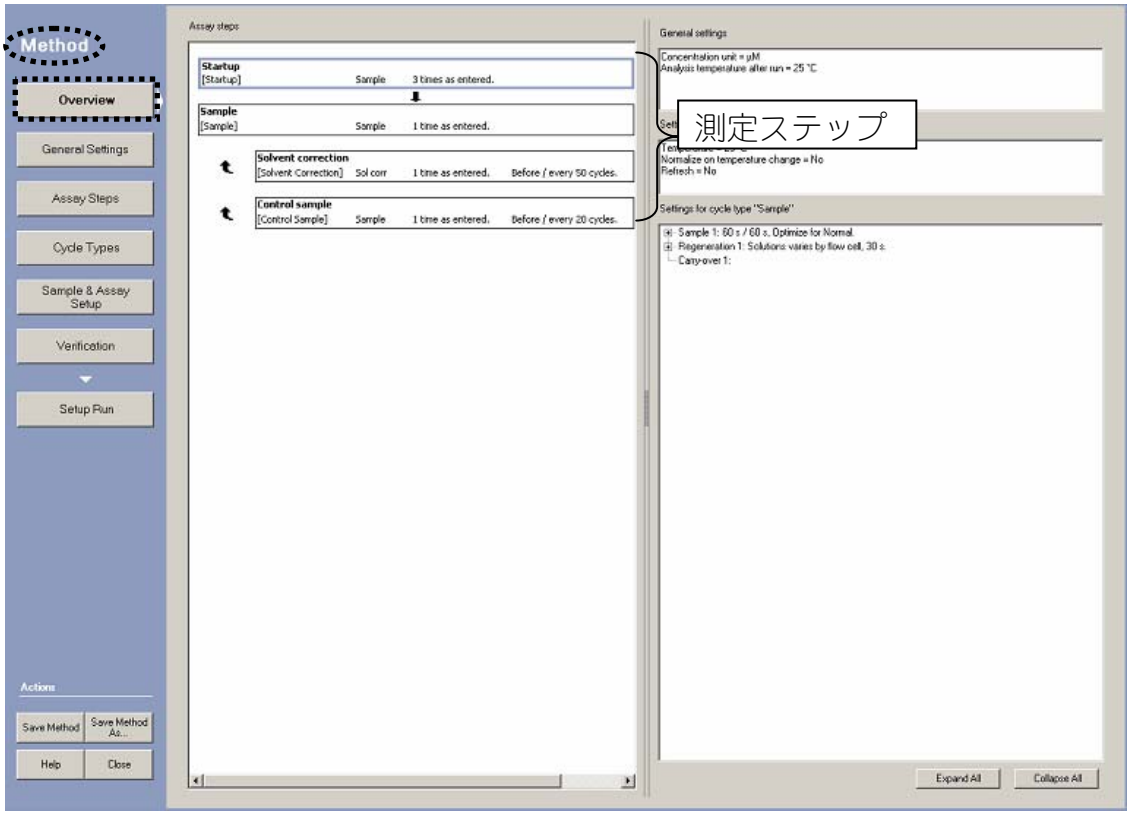


①：ナビゲーションパネル：順次ボタンをクリックしながら設定を進める。
②：測定の順番やサンプルの添加方法等の条件設定を行う。各ステップにより設定項目は異なる。
③：設定情報が表示される。

メソッドを編集する段階ではナビゲーションパネルの最上部に**"Method"**と表示されている。

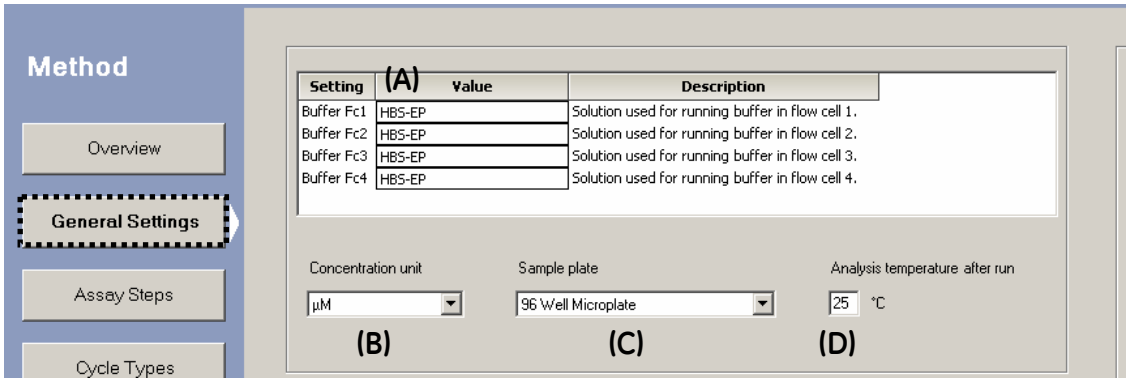
① **Overview**

測定順序（測定ステップ）が表示される。設定項目なし。



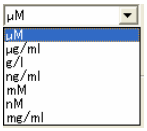
② **General Settings**

ランニング緩衝液、濃度単位、使用プレート、測定終了後の温度設定を行う。



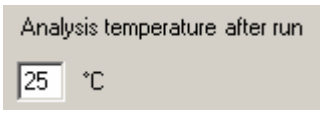
(A)：**Value**（ランニング緩衝液の入力）

(B)：**Concentration unit**（濃度単位の選択）



(C)：**Sample plate**（サンプルプレートの選択）

(D)：**Analysis temperature after run**（測定終了後の検出温度の設定）

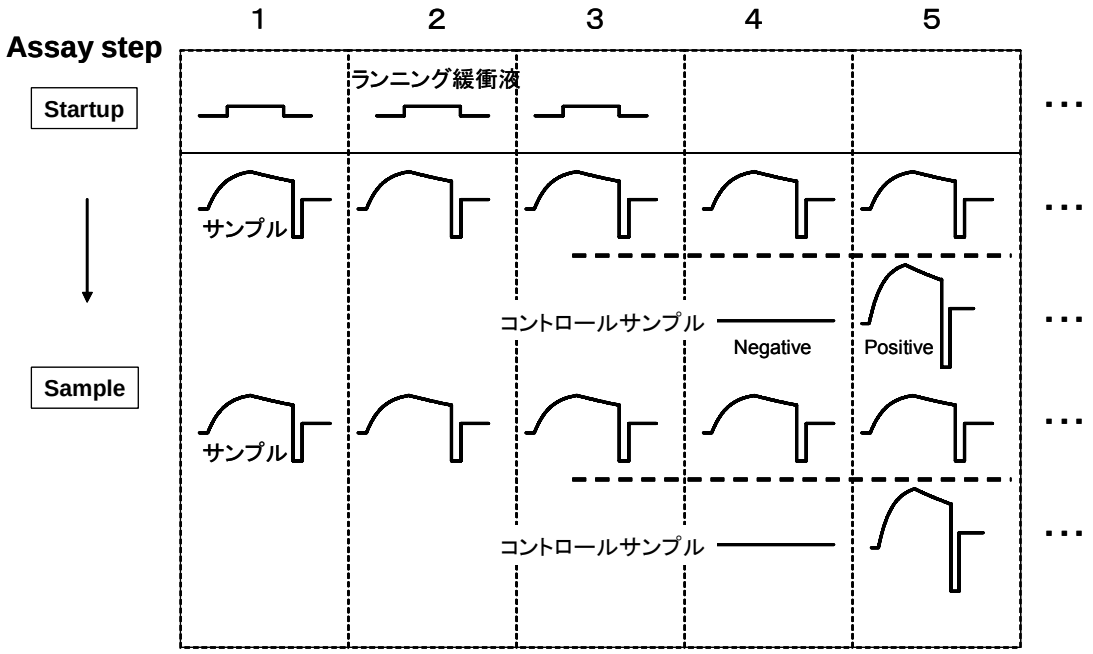


③ **Assay Steps**

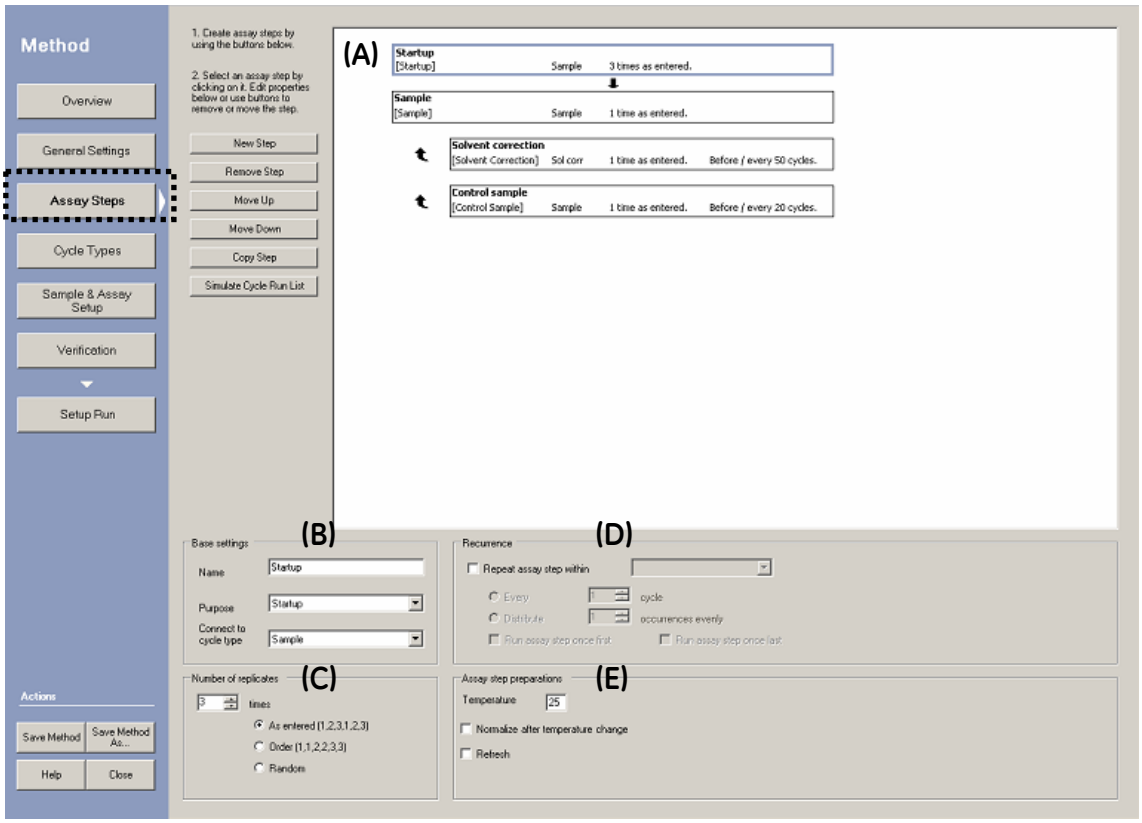
測定ステップの作成を行い、測定のアウトラインを作成する。
それぞれの測定ステップは Startup, Sample, Control sample 等の測定目的を持っている。

＜測定ステップの例＞

ステップ 1（Startup）ランニング緩衝液をアナライトにしたダミー測定
ステップ 2（Sample）サンプルを 5 種測定
（Control sample）コントロールサンプル測定
（Sample）サンプルを 5 種測定
（Control sample）コントロールサンプル測定



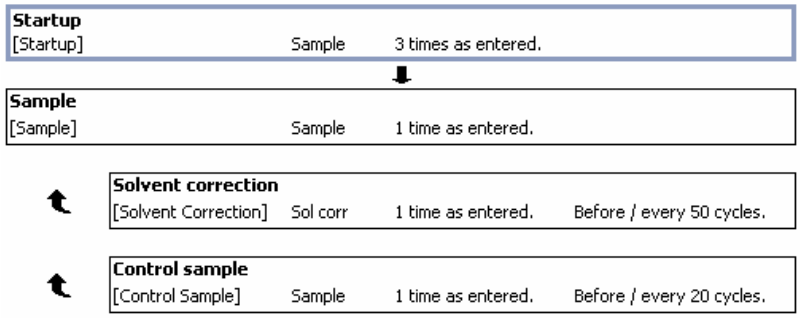
Assay Steps には 5 つの設定項目がある。



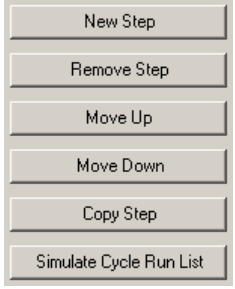
正しく設定するためには(A)、(B)および(D)の理解が必須である。

(A) **Assay step**

測定ステップの作成と各測定ステップの配置を行う。



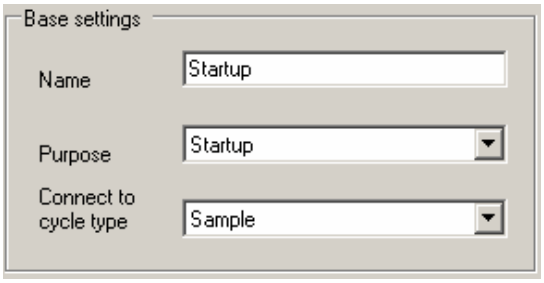
各ステップの配置はボタン操作で行う。



ステップの作成
削除
ステップの繰り上げ
繰り下げ
ステップのコピー
測定サイクルのシミュレーション

(B) **Base settings**

測定ステップの名称入力、測定目的の選択、測定プロトコルの選択を行う。



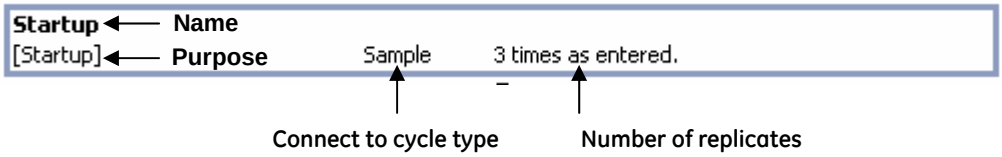
Name　：測定ステップの名称を入力する。名称は任意であるが、Purpose の名称と同じにするとわかりやすい。

Purpose　：各測定ステップを"何のために"実行するかを設定する。これは解析ソフトウェアにおいて測定ステップを適切に認識するために必要かつ重要な項目である。

(1) **Sample**　：アナライト
(2) **Calibration**　：濃度測定の検量線
(3) **Conditioning**　：センサー表面の洗浄
(4) **Control Sample**　：コントロールサンプル
　＊ Sample ステップ内で使用する。
(5) **Undefined**　：他に該当しないステップの場合に選択
(6) **Solvent Correction**　：低分子化合物測定の溶媒補正
　＊ Sample ステップ内で使用する。
(7) **Startup**　：ダミー測定

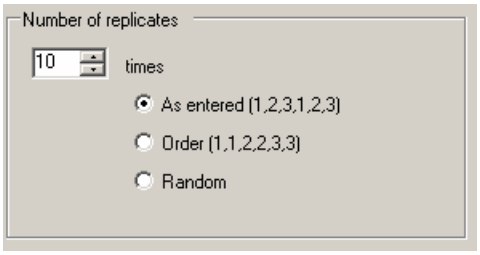
Connect to cycle type：　後述する **Cycle Types** 画面で定義した測定条件との関連づけを行う。サイクルタイプはプルダウンメニューに一覧で表示される。

＜測定ステップの設定内容表示＞



(C) **Number of replicates**

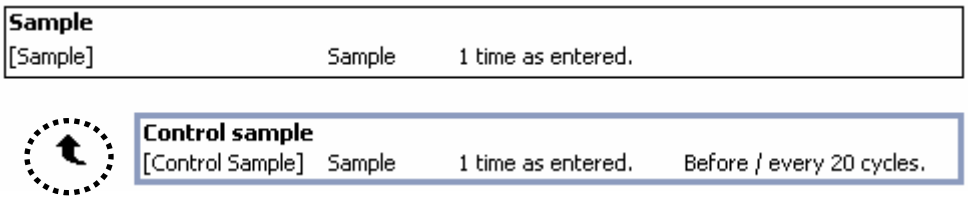
同一サンプル（コントロールサンプル等も同じ）について複数回測定する場合には回数を入力する。



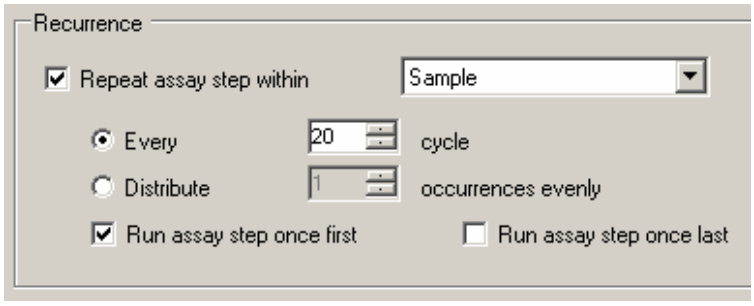
あわせ測定順序を **As Entered**、**Order** および **Random** から選択する。

(D) **Recurrence**

Control sample、Solvent correction、Calibration などの測定ステップを Sample 測定ステップ内で定期的に繰り返し実行する際の設定項目である。

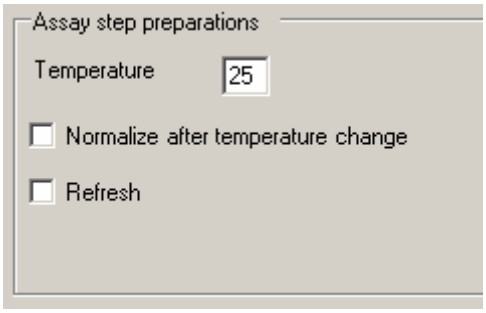


測定ステップの前には マークが表示される。



Repeat assay step within　：Recurrence を実行するステップの選択
Every　：測定頻度の入力（測定間隔）
Distribute　：測定頻度の入力（測定回数）
Run assay step once first　：ステップの最初に実行する場合チェックする
Run assay step once last　：ステップの最後に実行する場合チェックする

(E) **Assay step preparations**

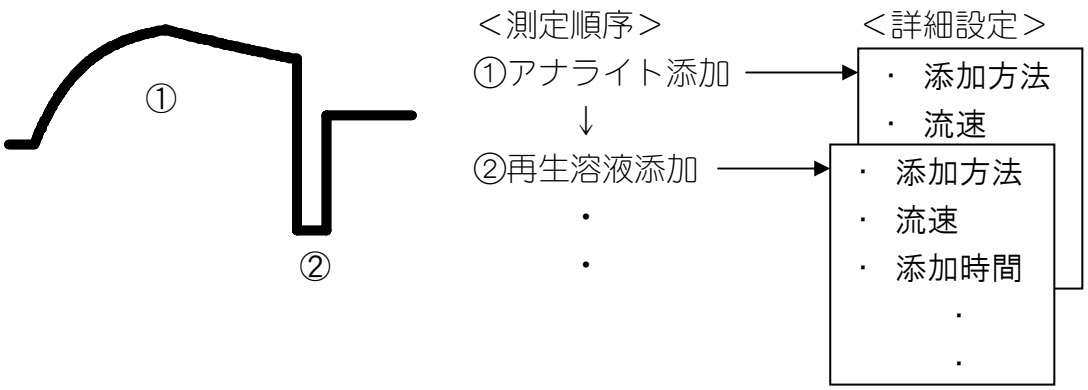


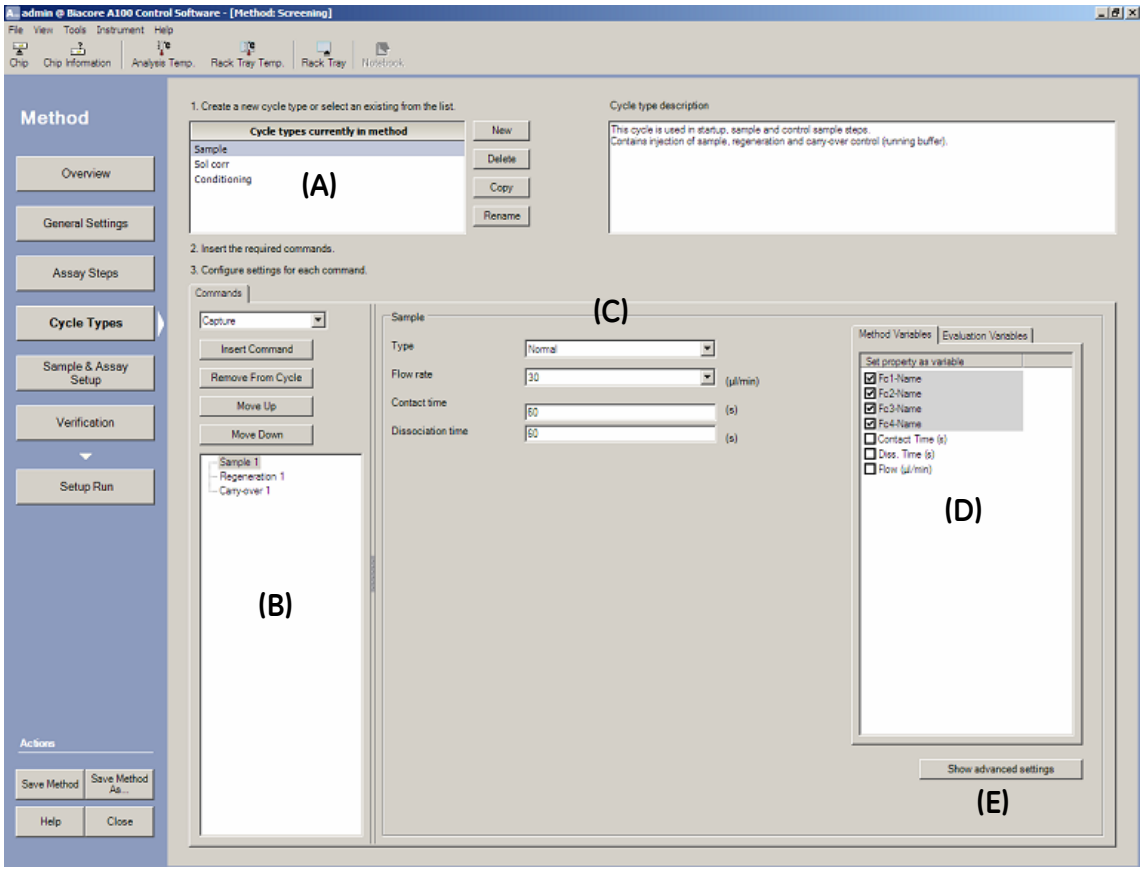
測定温度の入力を行う。デフォルトは 25℃。

（注意）
装置の **Menu→Set Analysis Temperature** で設定した温度と異なる場合はここで入力した温度に安定した後、測定がスタートする。
その際は **Normalize after temperature change** と **Refresh** にチェックを入れる。

④ Cycle Types

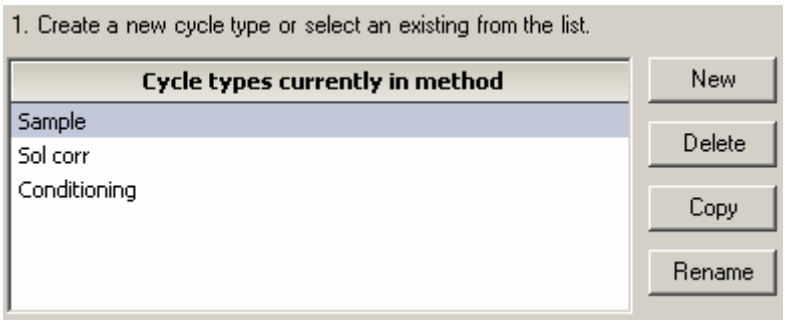
測定ステップごとの詳細な測定条件の設定を行う。





(A) サイクルタイプの作成、削除、名前の変更

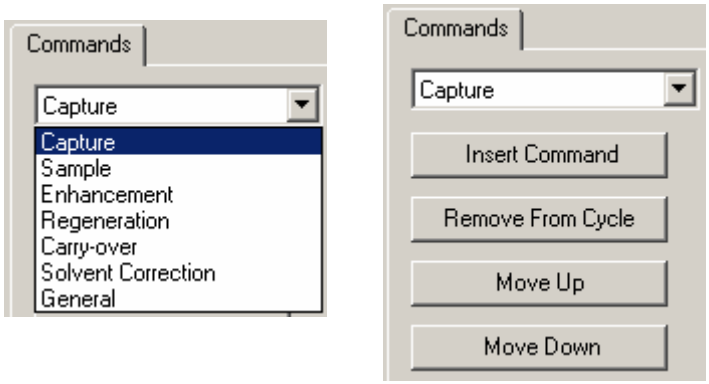
前述した Assay Steps において各ステップの詳細な測定条件は、ここで登録されているサイクルタイプの中から選択する。



予め使用するものが登録されている。通常はその中から選択し以下(B)□(C)の順に設定を進める。新規作成は **New**、削除する場合には **Delete** をクリックする。

(B) 各サイクルのコマンドの設定およびパラメータの入力

各コマンドはプルダウンメニューから選択し、**Insert Command** により追加する。



また各コマンドの順序は **Move Up** および **Move Down** にて調整する。
コマンドには以下の 7 種類ある。

(1) **Capture**
リガンドをキャプチャーさせるときの添加コマンド。

(2) **Sample**
アナライトの添加コマンド。

(3) **Enhancement**
アナライトの結合確認またはシグナル増幅として 2 次抗体などを添加するコマンド。

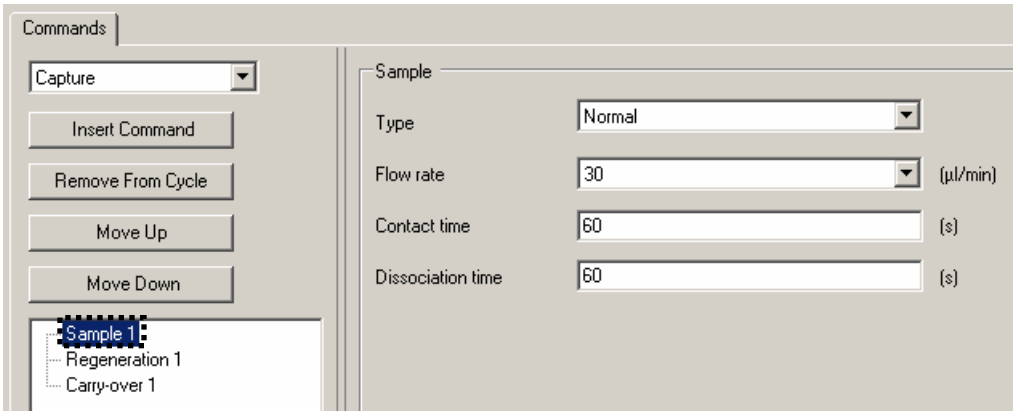
(4) **Regeneration**
再生溶液の添加コマンド。
(5) **Carry-over**
キャリーオーバーチェックをするためのコマンド。30 µl/min で 30 秒間ランニング緩衝液を添加する。低分子化合物をアナライトにする場合は測定の最後に挿入することを推奨する。
(6) **Solvent Correction**
溶媒補正溶液を添加するためのコマンド。30 µl/min で 30 秒間溶媒補正溶液を添加する。
(7) **General**
Sample コマンドと同等の機能をもつコマンド。ただし General のコマンドで測定したデータは解析できない。

使用頻度が高いのは **Sample**、**Regeneration**、**Capture** などである。
中でも **Sample** は解析ソフトウェアで解析を実行する際に必須のコマンドである。

(C) 各コマンドの条件設定

コマンドを選択し、添加方法、添加時間、流速等を設定する。

Sample



Type (添加モード)

Low Sample Consumption

サンプルの消費量が少ない。消費量：Injection volume + 25µl

High Performance Kinetics

サンプル添加時の希釈は最低限に抑えられる。

反応速度定数、解離定数算出時に使用する。

消費量：Injection volume + 50µl

Normal

上記 2 法の中間。

スクリーニング目的の測定に使用する。

消費量：Injection volume + 36µl

Flow rate

10 、30µl/min のいずれかを選択する。

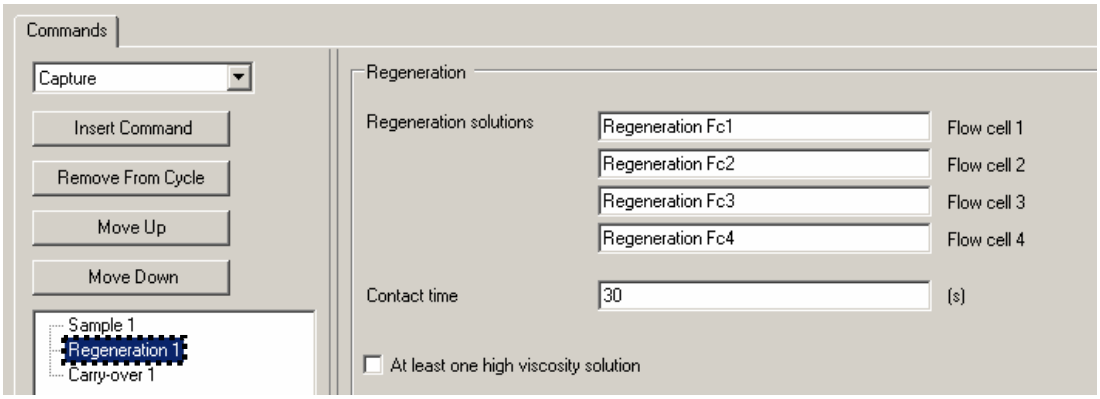
Contact time

アナライト添加時間を秒数で入力する。

Dissociation time

解離時間を秒数で入力する。

Regeneration



Regeneration solutions

各フローセルに添加する再生溶液名を入力する。

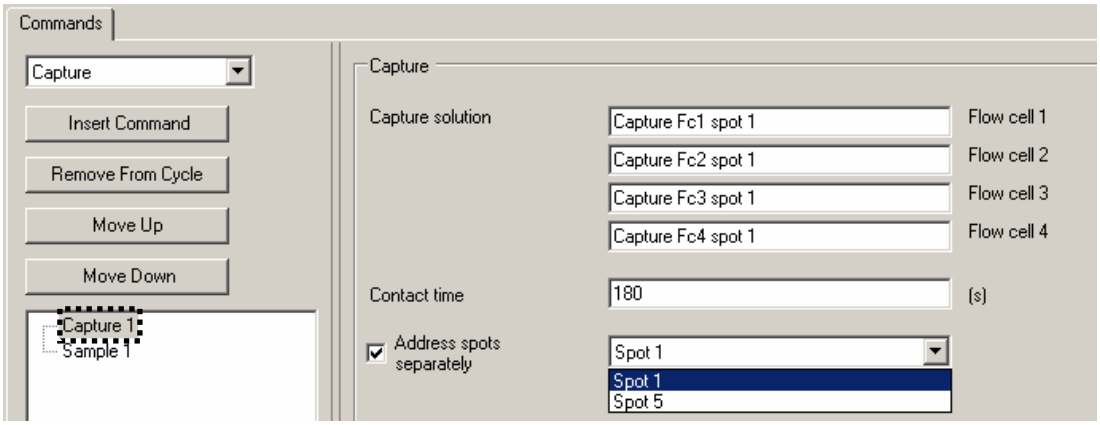
Contact time

再生溶液添加時間を秒数で入力する。

At least one high viscosity solution

粘性の高い再生溶液を使用する場合にチェックを入れる。
（35%以上のグリセロール、40%以上のエチレングリコール等を使用する場合）

Capture



Capture solution

キャプチャーする分子名を入力する。

Contact time

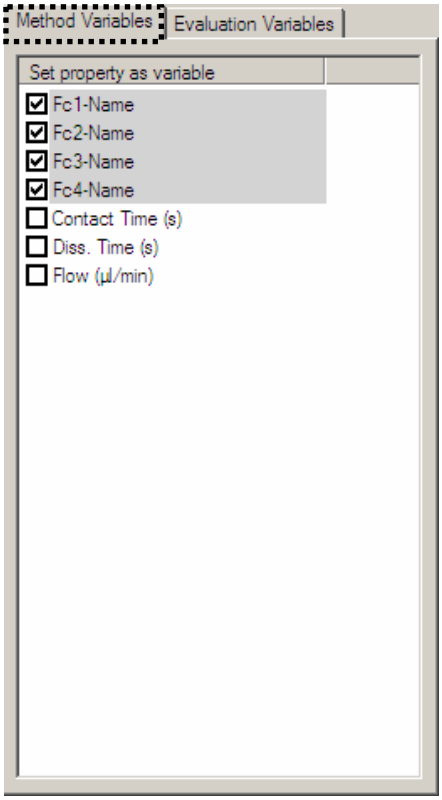
添加時間を秒数で入力する。

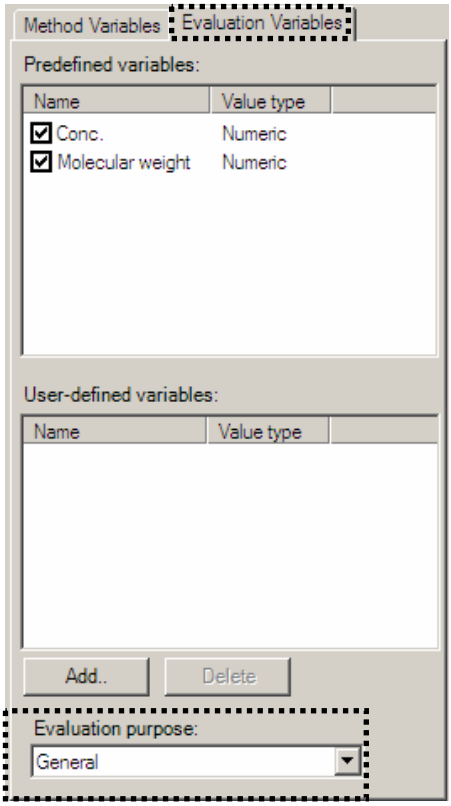
Address spots separately

キャプチャーするスポットを選択する。(spot1 もしくは spot5)

(D) 各測定サイクルの変数の設定

変数設定には **Method Variables** と **Evaluation Variables** の 2 つがある。





(1) **Method Variables**

各測定サイクルのコマンドおよびパラメータの変数の設定。通常 Sample コマンドの変数の設定は **Fc1-Name**, **Fc2-Name**, **Fc3-Name**, **Fc4-Name** にチェックが入っている。測定サイクルごとに添加条件を変更する場合にはその項目にチェックを入れる。

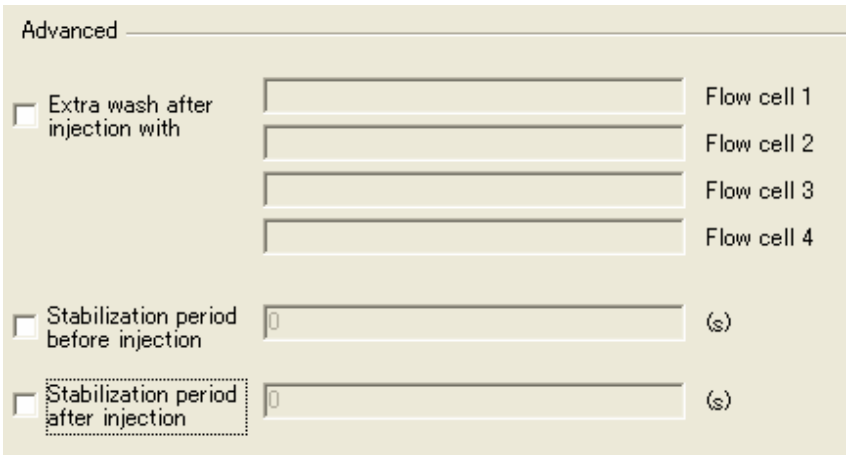
Contact Time (s)　：添加時間
Diss. Time (s)　：解離時間
Flow (µl/min)　：流速

(2) **Evaluation Variables**

解析ソフトウェアに反映される変数の設定および解析目的の設定。
通常サンプルコマンドの変数の設定は **Conc.**にチェックが入っている。また **Evaluation purpose :**は **General** が選択されている。

(E) **Show advanced settings**

各コマンドでエクストラな条件設定を行う場合にクリックする。
コマンドにより設定できる項目は異なる。



Extra wash after injection with

サンプル添加後に指定した溶液でフローセル以外の流路系を洗浄する。
低分子化合物測定を行う際には 50%DMSO を用いる。

Stabilization period before injection

サンプル添加前の待ち時間。

Stabilization period after injection

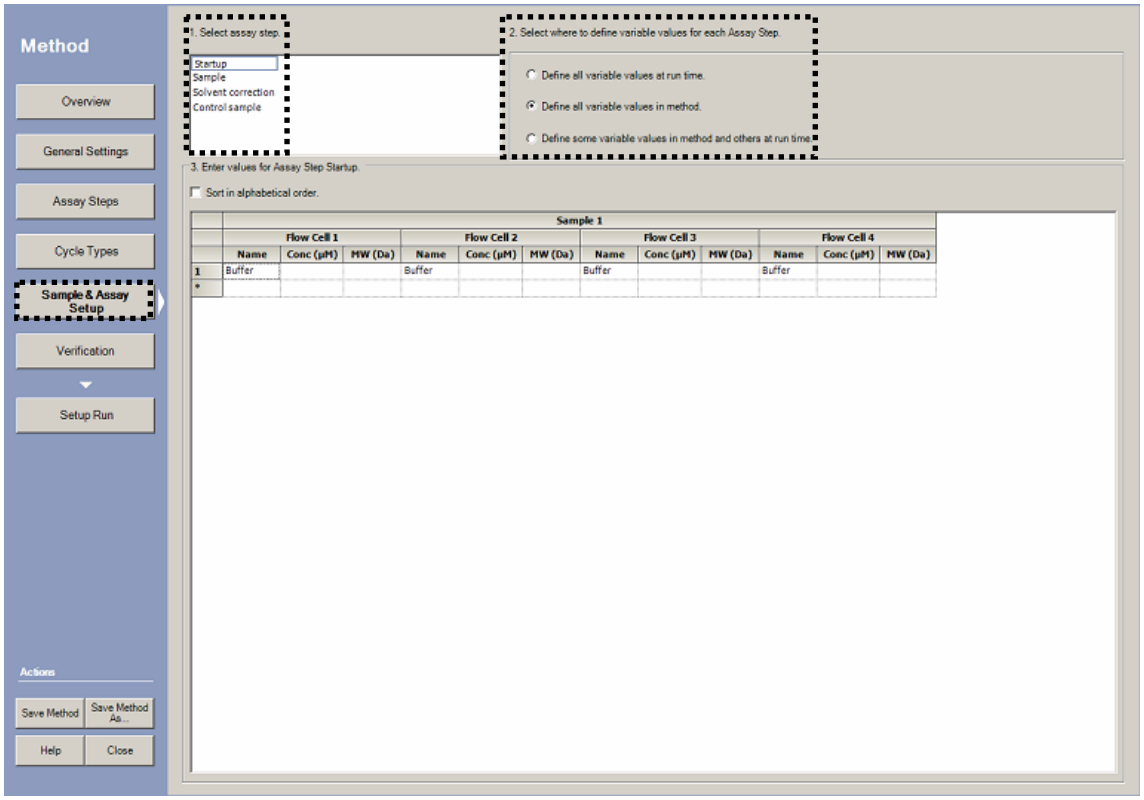
サンプル添加後の待ち時間。

Flow rate

キャプチャー時の流速。10、30µl/min で選択可能。

⑤ Sample & Assay Setup

各ステップにおける Variable なパラメータの入力方法について設定を行う。
Select assay step で設定するステップを選択し、Select where to define variable values for each Assay Step で入力方法を選択する。



入力方法

Define all variable values at run time

Setup Run の Sample & Assay Setup で測定開始直前に入力する。

Define all variable values in method

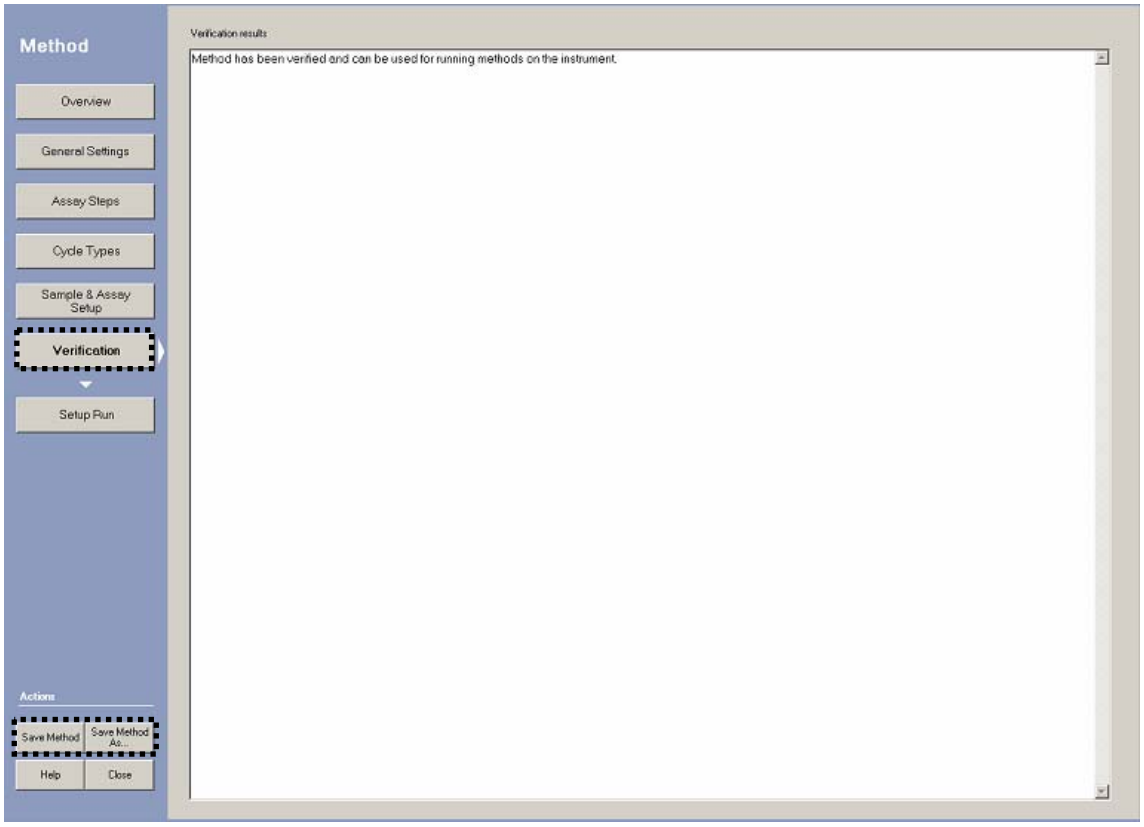
現画面上で入力する。頻繁にこのメソッドを使用し、毎回変更がないサンプル情報があればここで入力しておくと便利である。

Define some variable values in method and others at run time

現画面上で入力するパラメータと Setup Run の Sample & Assay Setup で入力するパラメータの選択が可能。

⑥ Verification

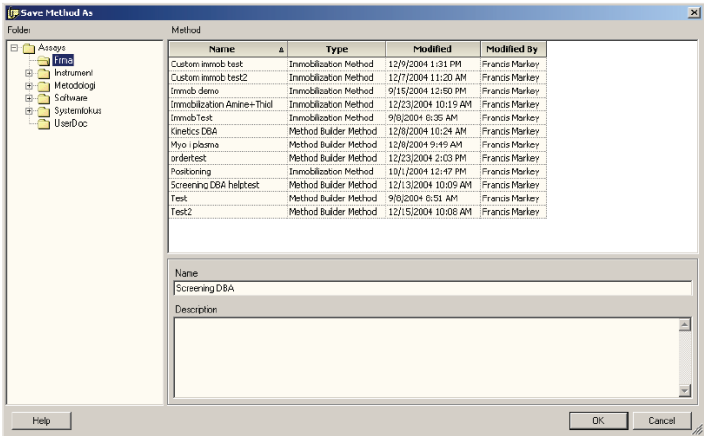
作成したメソッドのチェックを行う。



メソッドの設定に不備がなければ
“Method has been verified and can be used for running methods on the instrument”
と表示される。
問題がある場合には該当部分が表示される。指示にしたがってって修正する。

↓

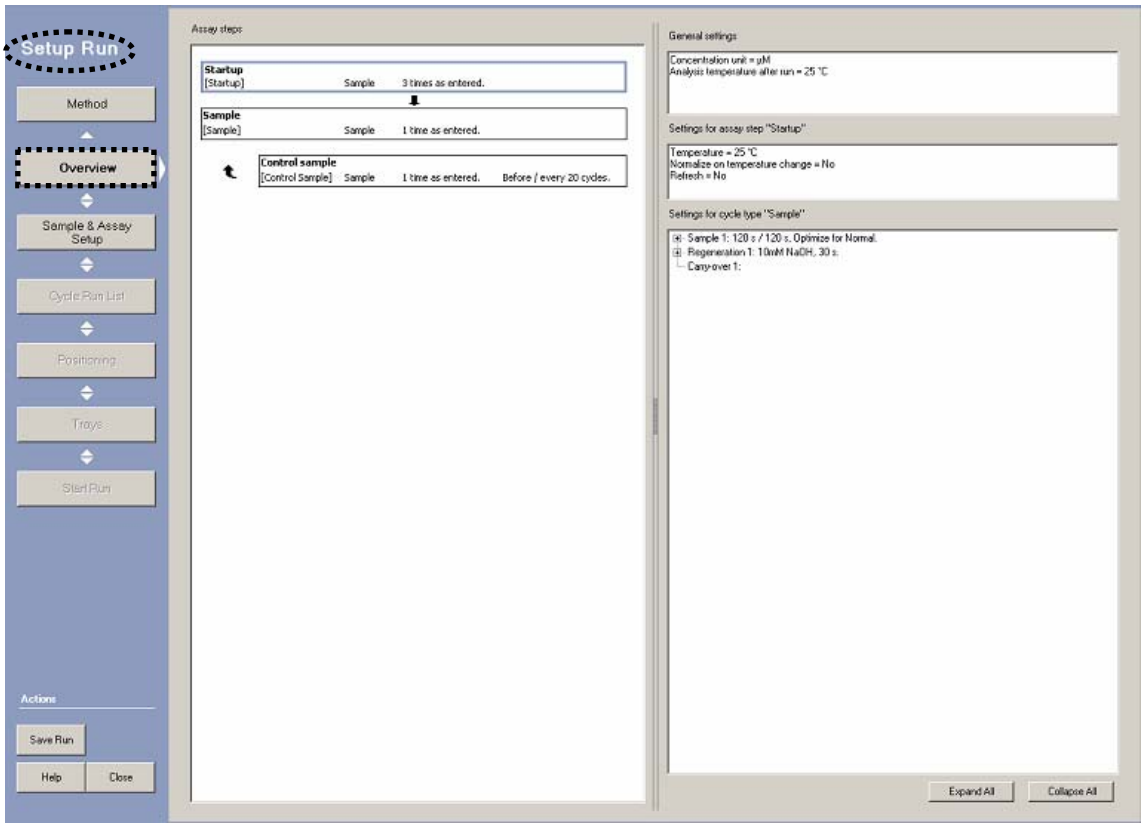
ここまで作成したメソッドを保存する場合にはナビゲーションパネルの **Save Method As...**をクリックし、所定のフォルダにファイル名をつけて保存する。



↓

⑦ **Setup Run** をクリックする。
ナビゲーションパネルの最上部が**"Setup Run"**に変わる。

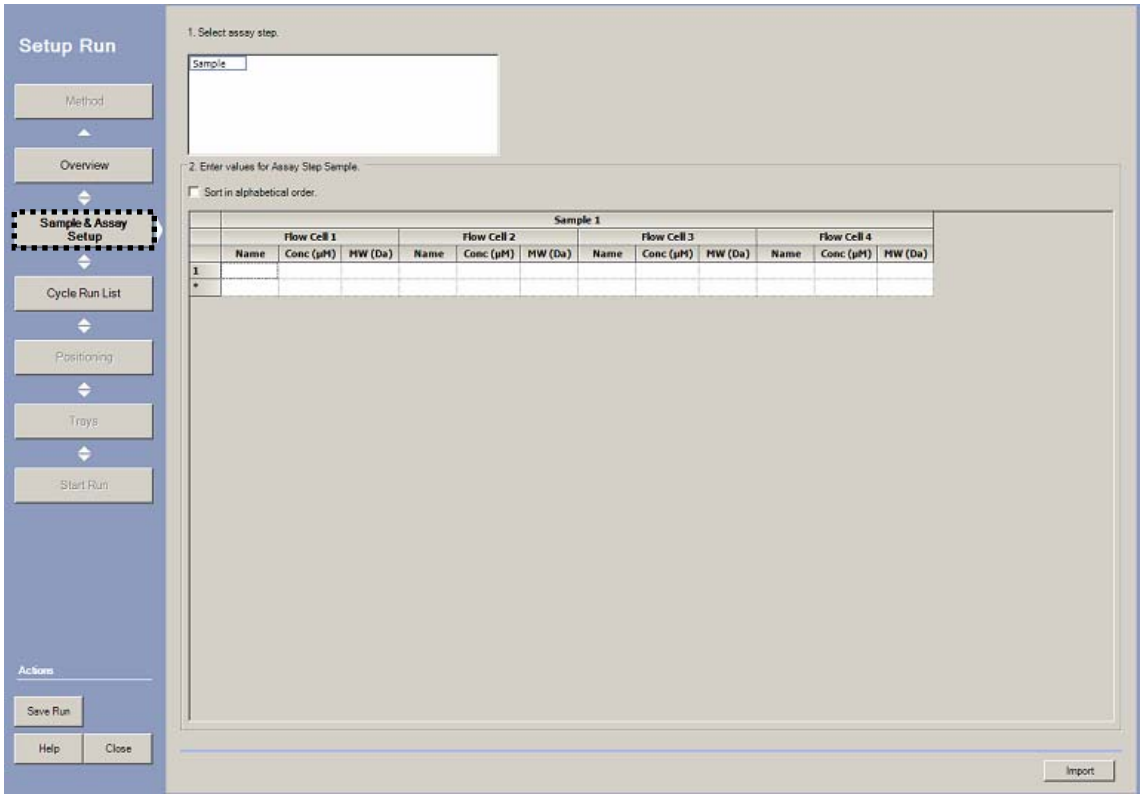
⑧ **Overview**
測定ステップを確認する。訂正する場合は **Method** をクリックし再設定する。

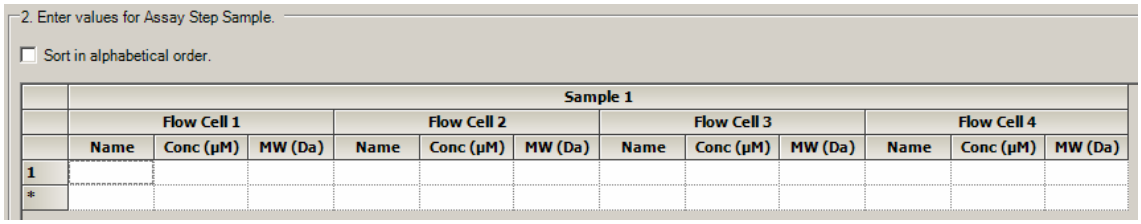


↓

⑨ Sample & Assay Setup

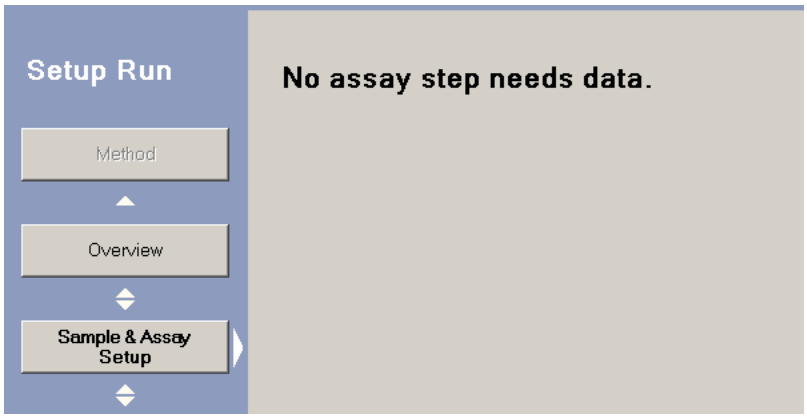
Method ステップ⑤の Sample & Assay Setup 時に **Define all variable values at run time** もしくは **Define some variable values in method and others at run time** を選択した場合はここでサンプル情報を入力する。





Name　　：アナライト名
Conc(µM)　　：濃度
MW(Da)　　：分子量

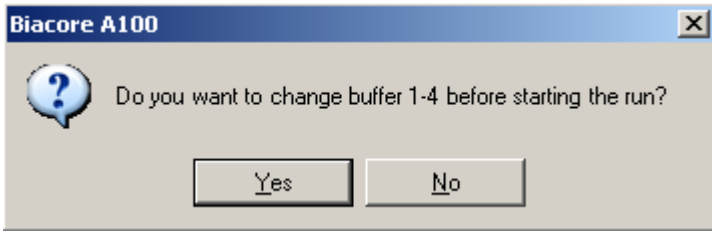
Method ステップ□の Sample & Assay Setup 時に **Define all variable values in method** を選択し、サンプル情報を入力した場合には下記表示となる。



↓

⑩ **Cycle Run List** をクリックする。

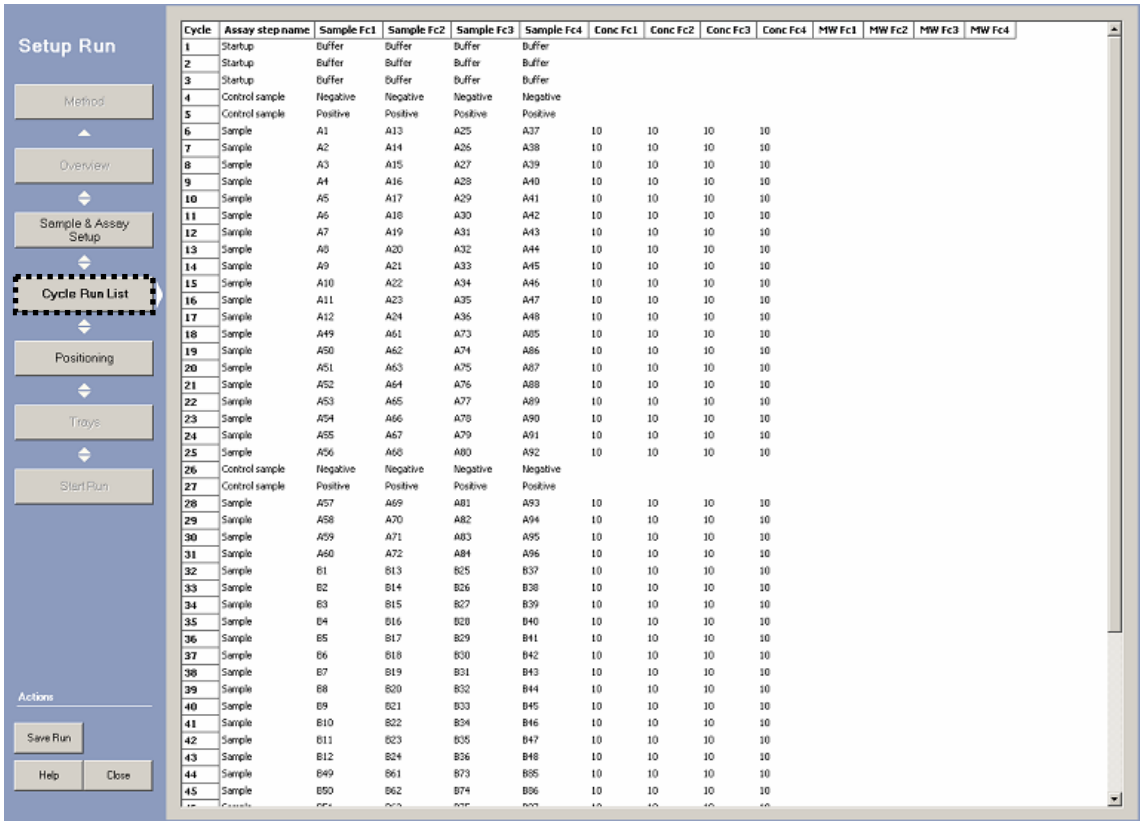
↓



測定前にランニング緩衝液を交換しない場合は **No** をクリックする。

↓

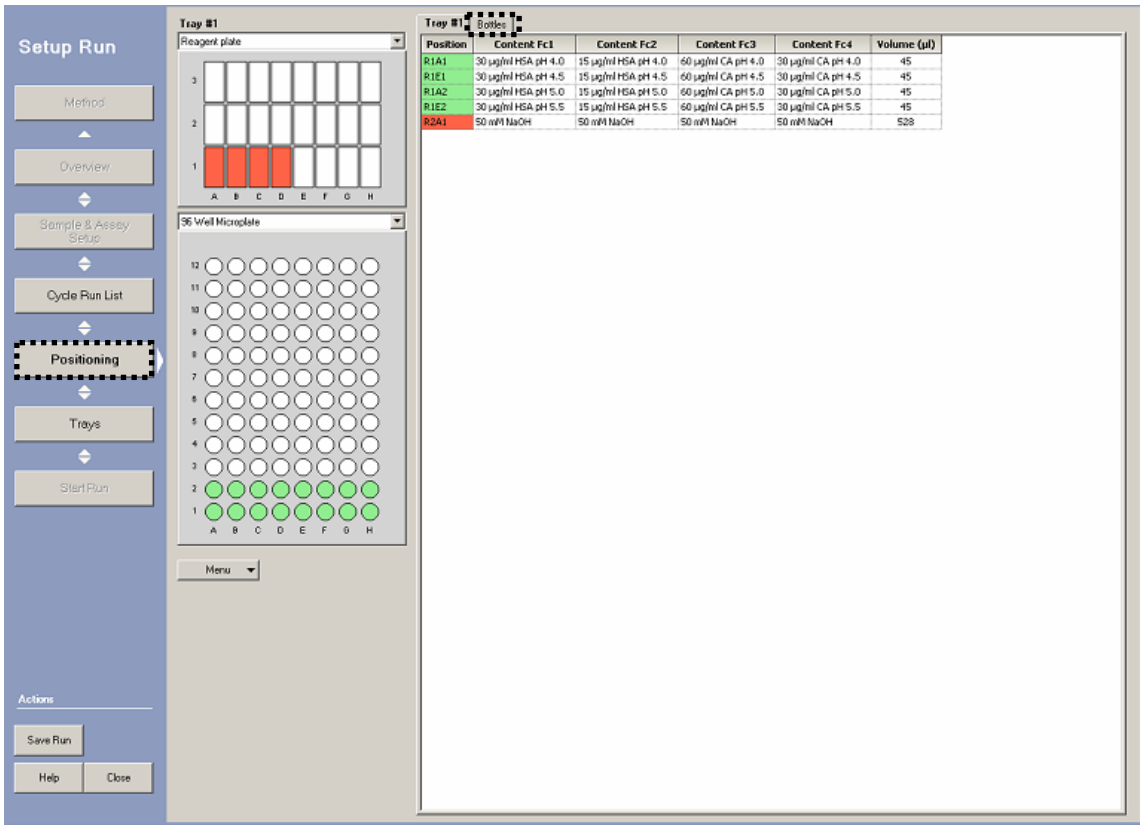
全測定サイクルのリストが表示される。設定した通りの順番に並んでいるか確認する。



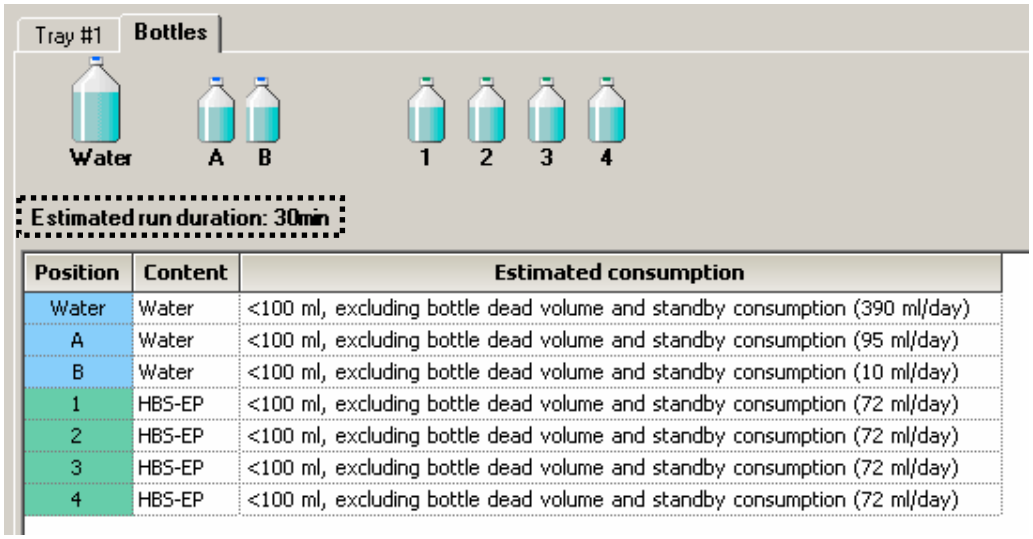
Cycle	Assay step name	Sample Fc1	Sample Fc2	Sample Fc3	Sample Fc4	Conc Fc1	Conc Fc2	Conc Fc3	Conc Fc4	MW Fc1	MW Fc2	MW Fc3	MW Fc4
1	Startup	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer								
2	Startup	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer								
3	Startup	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer								
4	Control sample	Negative	Negative	Negative	Negative								
5	Control sample	Positive	Positive	Positive	Positive								
6	Sample	A1	A13	A25	A37	10	10	10	10				
7	Sample	A2	A14	A26	A38	10	10	10	10				
8	Sample	A3	A15	A27	A39	10	10	10	10				
9	Sample	A4	A16	A28	A40	10	10	10	10				
10	Sample	A5	A17	A29	A41	10	10	10	10				
11	Sample	A6	A18	A30	A42	10	10	10	10				
12	Sample	A7	A19	A31	A43	10	10	10	10				
13	Sample	A8	A20	A32	A44	10	10	10	10				
14	Sample	A9	A21	A33	A45	10	10	10	10				
15	Sample	A10	A22	A34	A46	10	10	10	10				
16	Sample	A11	A23	A35	A47	10	10	10	10				
17	Sample	A12	A24	A36	A48	10	10	10	10				
18	Sample	A49	A61	A73	A85	10	10	10	10				
19	Sample	A50	A62	A74	A86	10	10	10	10				
20	Sample	A51	A63	A75	A87	10	10	10	10				
21	Sample	A52	A64	A76	A88	10	10	10	10				
22	Sample	A53	A65	A77	A89	10	10	10	10				
23	Sample	A54	A66	A78	A90	10	10	10	10				
24	Sample	A55	A67	A79	A91	10	10	10	10				
25	Sample	A56	A68	A80	A92	10	10	10	10				
26	Control sample	Negative	Negative	Negative	Negative								
27	Control sample	Positive	Positive	Positive	Positive								
28	Sample	A57	A69	A81	A93	10	10	10	10				
29	Sample	A58	A70	A82	A94	10	10	10	10				
30	Sample	A59	A71	A83	A95	10	10	10	10				
31	Sample	A60	A72	A84	A96	10	10	10	10				
32	Sample	B1	B13	B25	B37	10	10	10	10				
33	Sample	B2	B14	B26	B38	10	10	10	10				
34	Sample	B3	B15	B27	B39	10	10	10	10				
35	Sample	B4	B16	B28	B40	10	10	10	10				
36	Sample	B5	B17	B29	B41	10	10	10	10				
37	Sample	B6	B18	B30	B42	10	10	10	10				
38	Sample	B7	B19	B31	B43	10	10	10	10				
39	Sample	B8	B20	B32	B44	10	10	10	10				
40	Sample	B9	B21	B33	B45	10	10	10	10				
41	Sample	B10	B22	B34	B46	10	10	10	10				
42	Sample	B11	B23	B35	B47	10	10	10	10				
43	Sample	B12	B24	B36	B48	10	10	10	10				
44	Sample	B49	B61	B73	B85	10	10	10	10				
45	Sample	B50	B62	B74	B86	10	10	10	10				

⑪ **Positioning**

サンプル、試薬の位置が表示される。



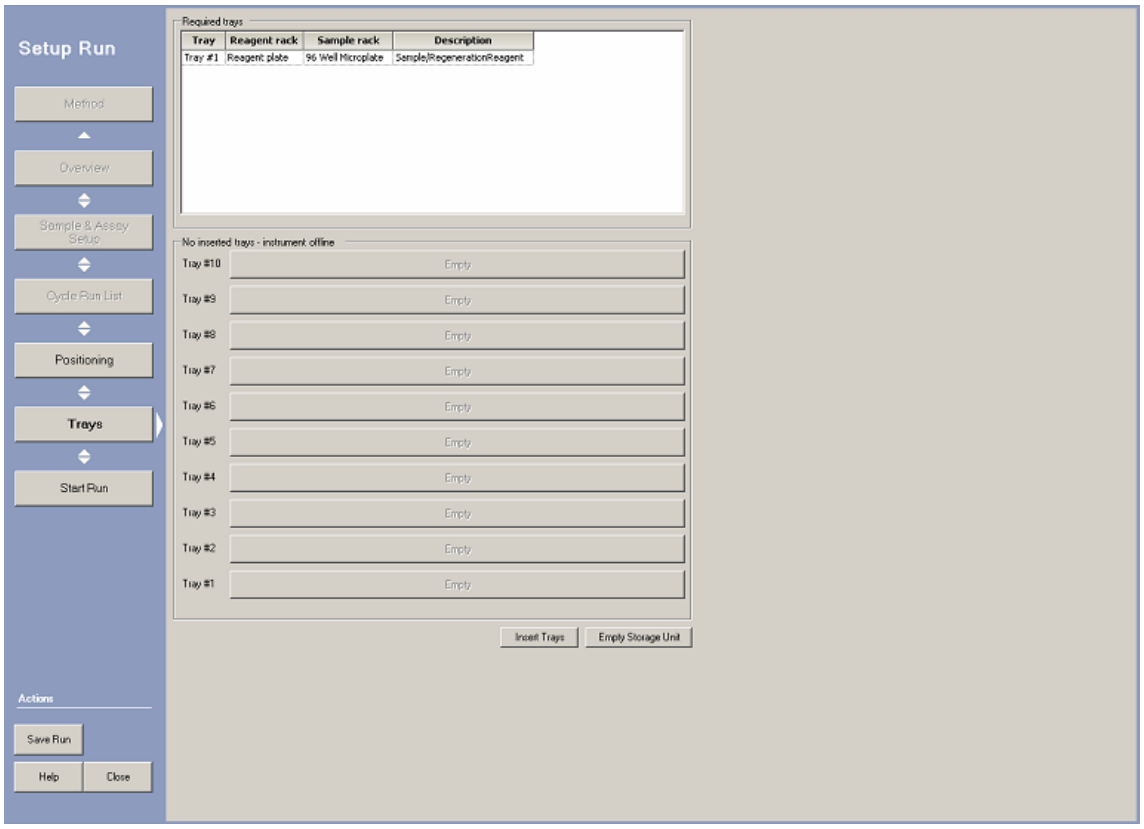
Bottles タブをクリックすると各緩衝液、Water(超純水)の必要量が表示される。
また Estimate run duration で測定に要す時間を確認することができる。



Position	Content	Estimated consumption
Water	Water	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (390 ml/day)
A	Water	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (95 ml/day)
B	Water	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (10 ml/day)
1	HBS-EP	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)
2	HBS-EP	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)
3	HBS-EP	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)
4	HBS-EP	<100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)

⑫ **Trays**

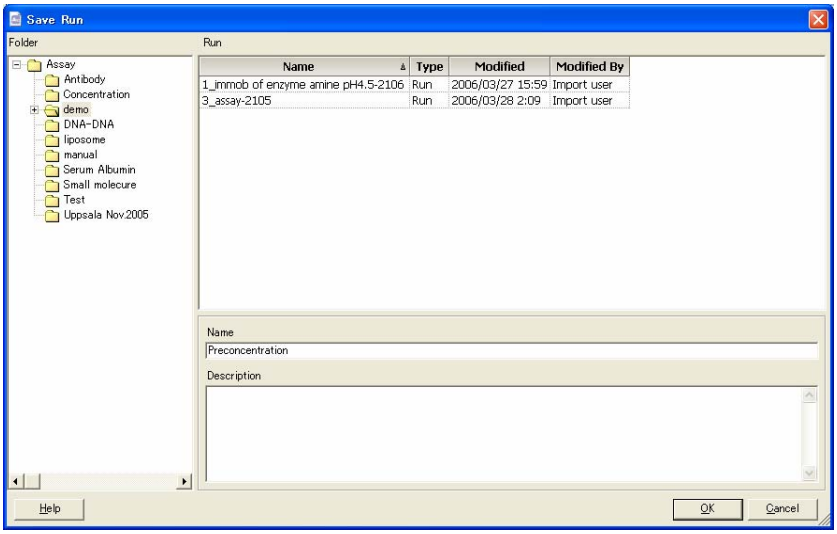
サンプル、試薬プレートをセットしたラックトレイを装置内に入れる。



Insert Trays をクリックする。

⑬ **Start Run** をクリックする。

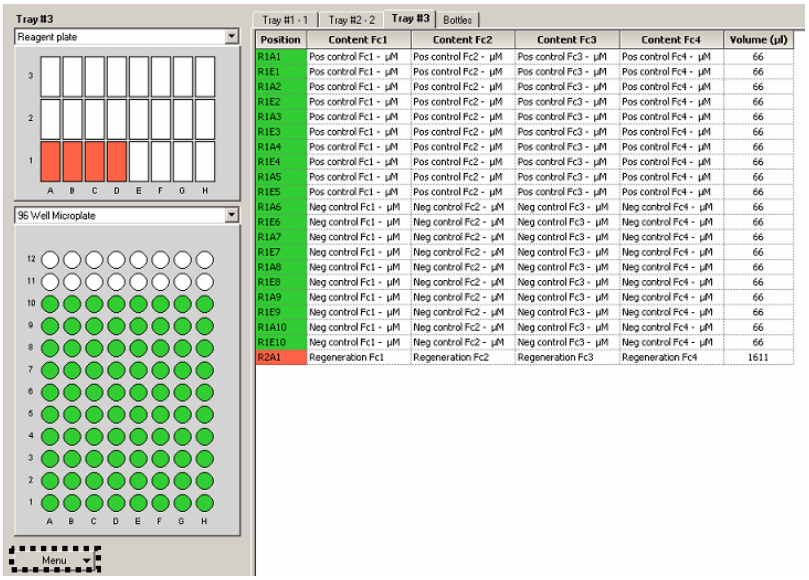
↓



ファイルの保存先を指定し、ファイル名を入力して **OK** をクリックすると測定が開始される。

5-2.　サンプル位置の設定と変更

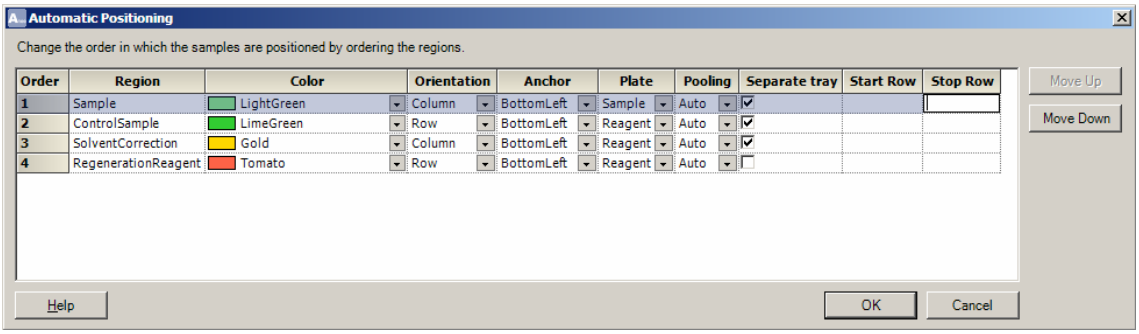
サンプル、試薬の配置はソフトウェアが自動で行う。通常は指示通り分注するが、位置を変更することも可能である。移動可能であればドラッグで動かすことができる。
またデフォルトのサンプル位置は、同一サンプルであっても、添加回数分、分別して配置されるように組まれている（例えば同一のコントロールサンプルであっても、異なるウェルに分けてセットするように指示される。）。
同一サンプルを同ウェルから使用したい場合は **Pooling** 機能を利用する。



Menu▼から **Automatic Positioning...**を選ぶ。

↓

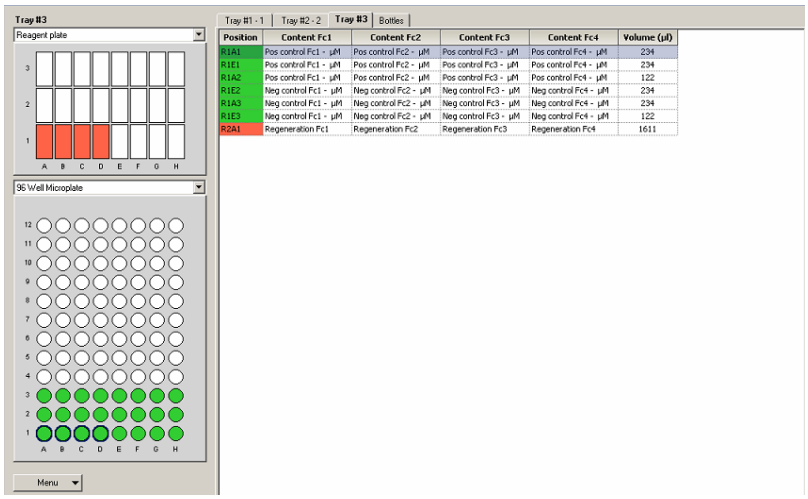
すべてのサンプルに関する配置設定を行うことができる。



↓

“**Pooling**”の項目は、デフォルトの状態では、**Auto** になっている。
同一バイアルからサンプリングしたい Region について、“**Pooling**”のプルダウンメニューから **Yes** を選択し、ダイアログ右下の **OK** をクリックする。

↓



なお、**Automatic Positioning** では下記項目の設定も可能。

Color　：表示する色。
Orientation　：サンプルの並べ方。行順、列順の選択をする。
Anchor　：スタート位置の設定。
Plate　：試薬プレート、マイクロプレートの選択。
Separate tray　：ラックトレイを複数枚使用する際にトレイを分けて配置する。
Start Row　：**1** マイクロプレート、もしくは試薬プレート上の測定開始列の指定
End Row　：**1** マイクロプレート、もしくは試薬プレート上の測定終了列の指定

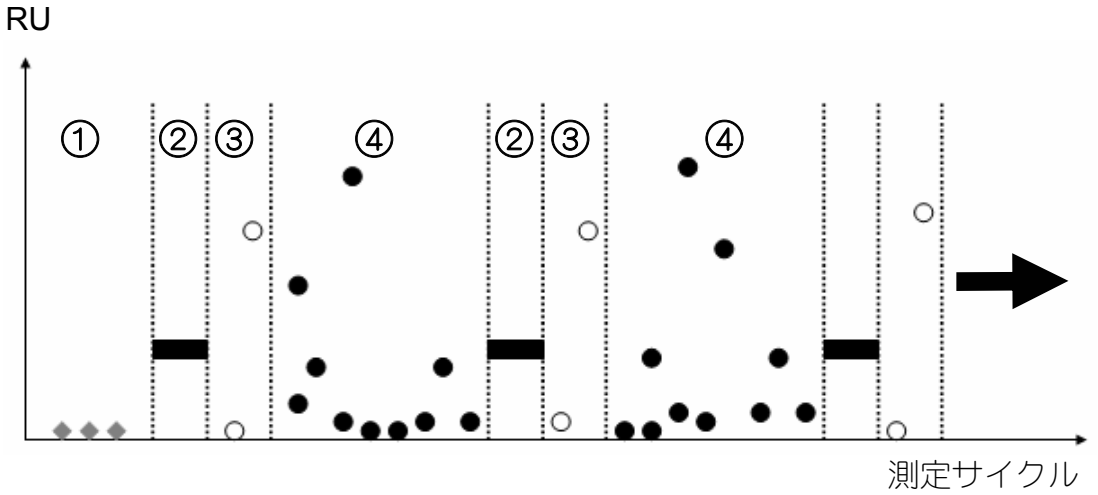
＊ **Start Row**、**End Row** を指定しない場合は詰めて配置される。例えば各 96 ウェルサンプルプレートの 1 列目と 12 列目にサンプルが分注されていない場合には、Start Row に 2、End Row に 1 1 と入力する。

（試薬の配置）
再生溶液、洗浄溶液などの試薬を 2 種類以上使用する場合、使用量の最も多い試薬をボトル A に設定することができる。
Menu▼から **Use bottle A for reagents** を選択し、”Yes”を選択する。

6. 目的別測定法

6-1. スクリーニング

基本的な測定サイクルは 3 ステップの繰り返しになる。



＜測定ステップ＞

① **Startup**

ランニング緩衝液を添加しセンサー表面を安定化する。

② **Solvent correction**（低分子化合物測定時のみ実施。124 ページ の 6-3 参照）

③ **Control sample**

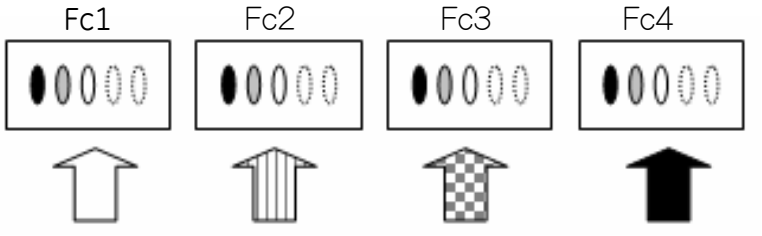
ネガティブコントロール、ポジティブコントロールの測定

④ **Sample**

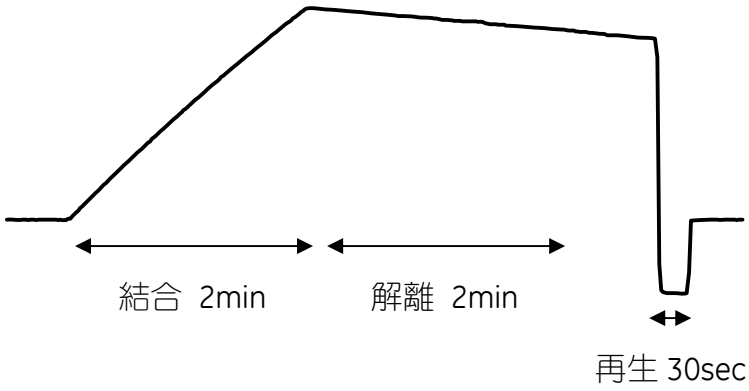
スクリーニングするサンプルの測定

スクリーニング用メソッドの作成について、一例を挙げて解説する。

＜測定例＞
スポット 1 と 2 に異なるリガンドを固定化し、スポット 3 をリファレンスとする。96 ウェルマイクロプレート 2 枚に分注したアナライトを各フローセルに添加し結合レスポンスを指標にスクリーニングを実施する。



＜測定条件＞
Startup　：ランニング緩衝液を 3 回添加。
Sample　：結合時間、解離時間：2 分間
再生：10 mM NaOH 30 秒間
Control sample　：20 サンプル測定ごとにネガティブコントロールとポジティブコントロールを 1 回ずつ測定。

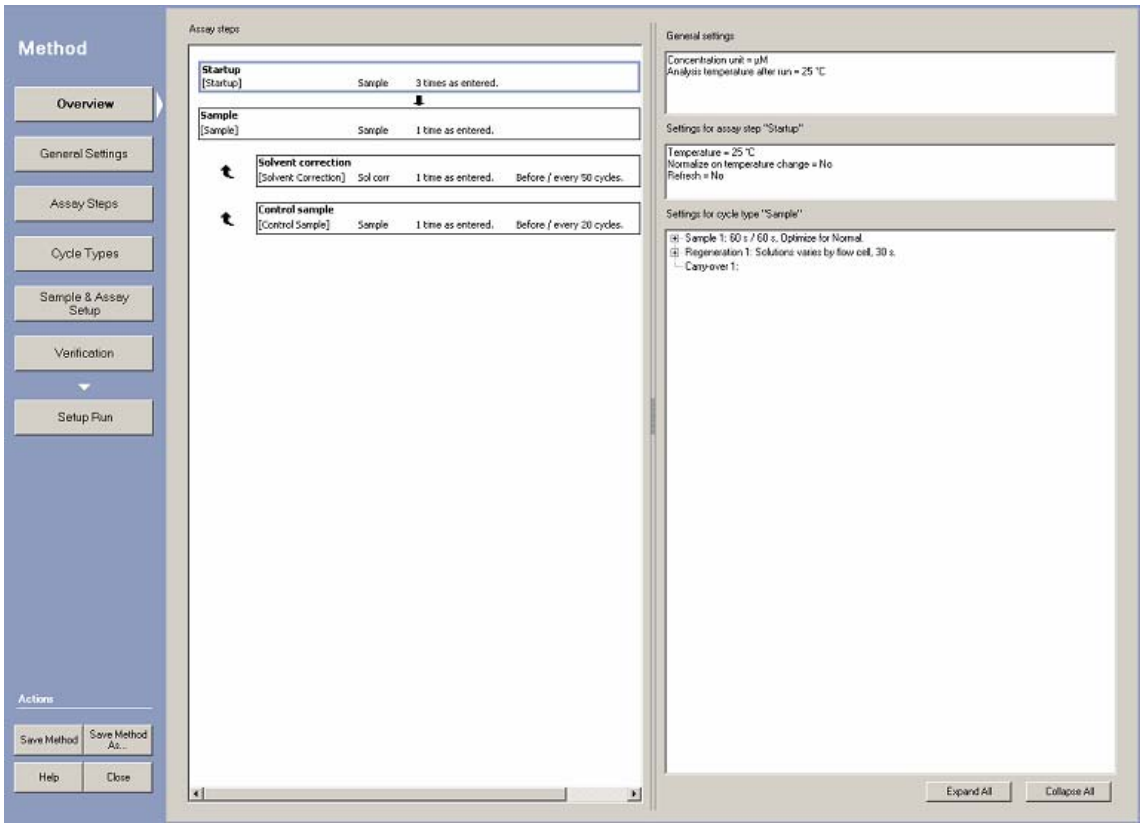


＜メソッド例＞

New Method をクリックし、

Biacore Methods / Screening / Screening を選択し **OK** をクリックする。

↓



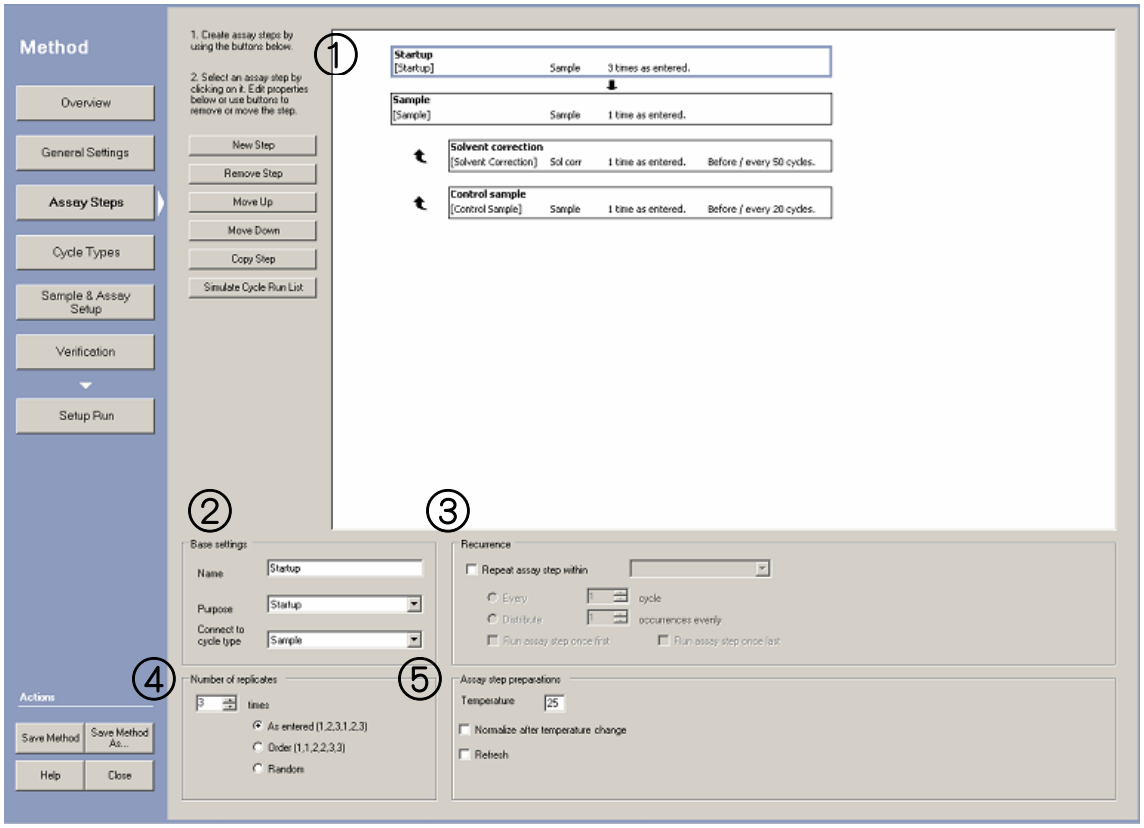
General Setting をクリックする。

↓

使用ランニング緩衝液、濃度単位、サンプルプレート（96 ウェル）、温度を設定し **Assay Steps** をクリックする。

↓

Assay steps



① Assay step

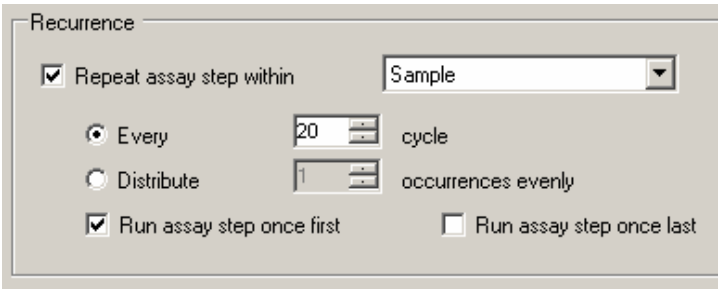
アナライトが低分子化合物でない場合には、Solvent Correction を選択し **Remove Step** で削除する。

② Base settings

変更なし

③ Recurrence

Control sample ステップを選択し Recurrence（繰り返し測定）の設定を行う。

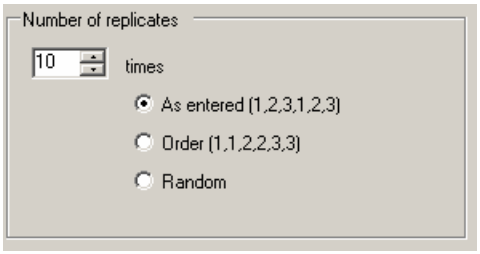


Repeat assay step within で **Sample** を選択する。

Every にチェックを入れ、20cycle に設定する。

Run assay step once first、**Run assay step once last** にチェックを入れる。

④ **Number of replicates**



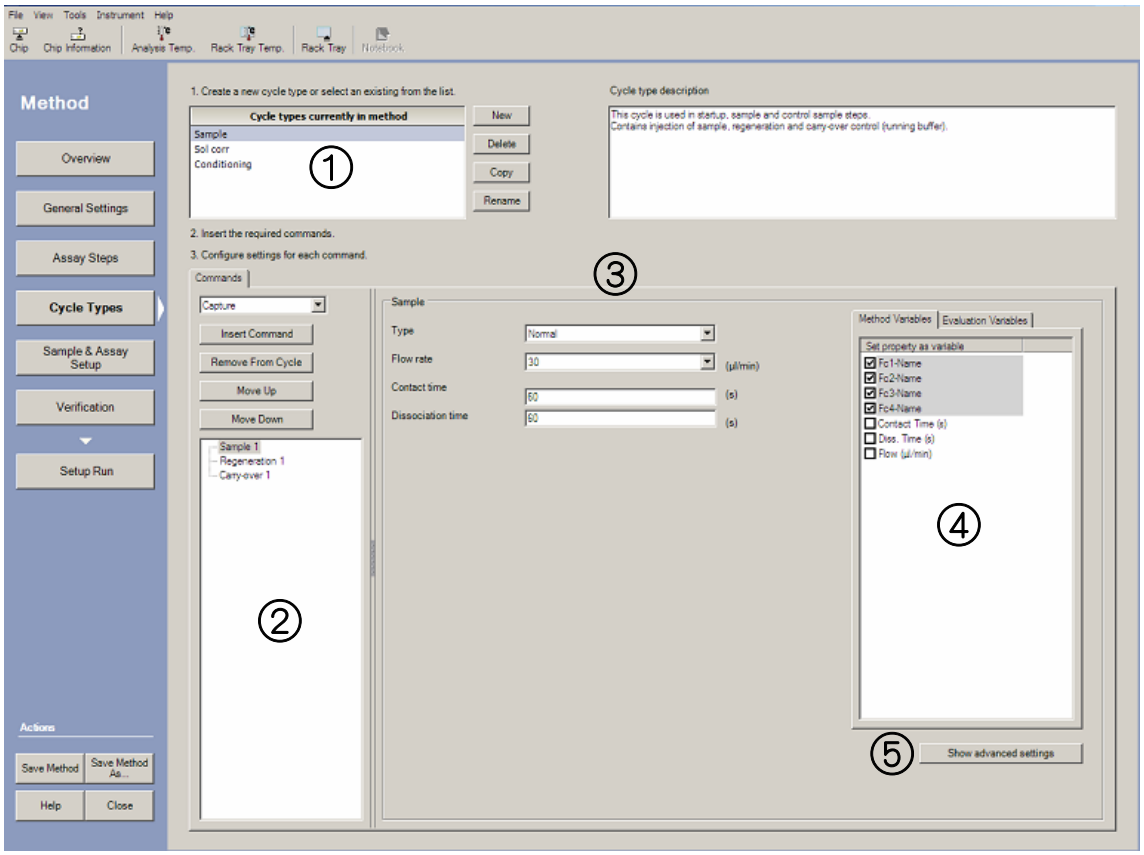
Startup ステップを選択し
3times に設定。**As entered(1,2,3,1,2,3)**にチェックを入れる。

⑤ **Assay step preparations**
測定温度を設定する。デフォルトは 25℃である。

Cycle types をクリックする。

↓

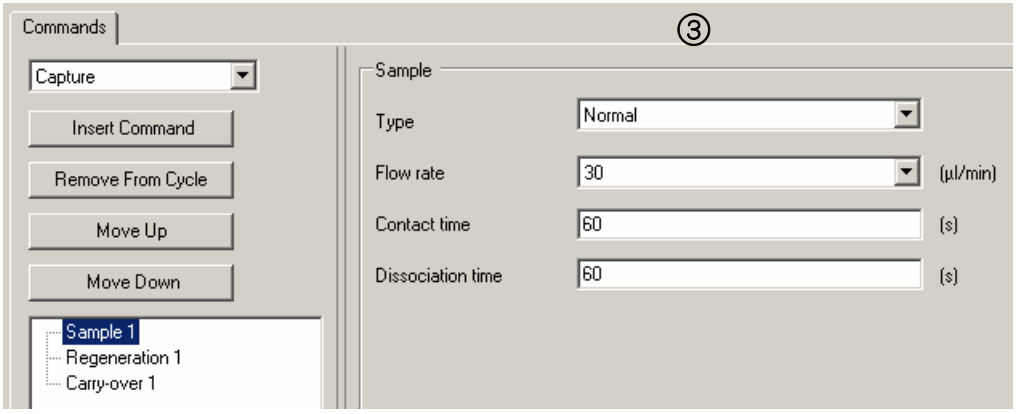
Cycle types



① Cycle types currently in method から **Sample** を選択する。

② 各 **Command** のパラメータ入力

Sample1



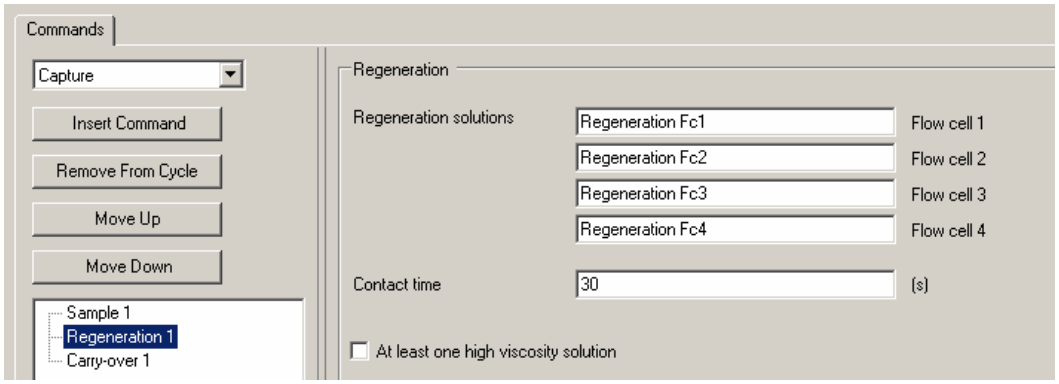
Type (Sample の添加モード)　：Normal

Flow rate　：30

Contact time　：120

Dissociation time　：120

Regeneration 1

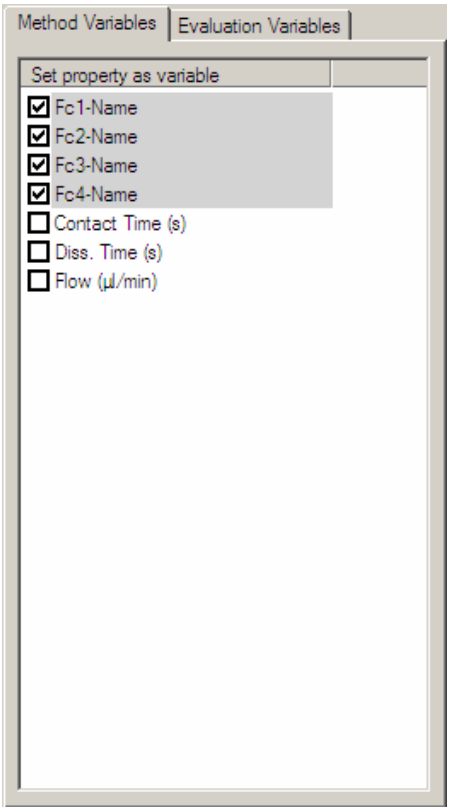


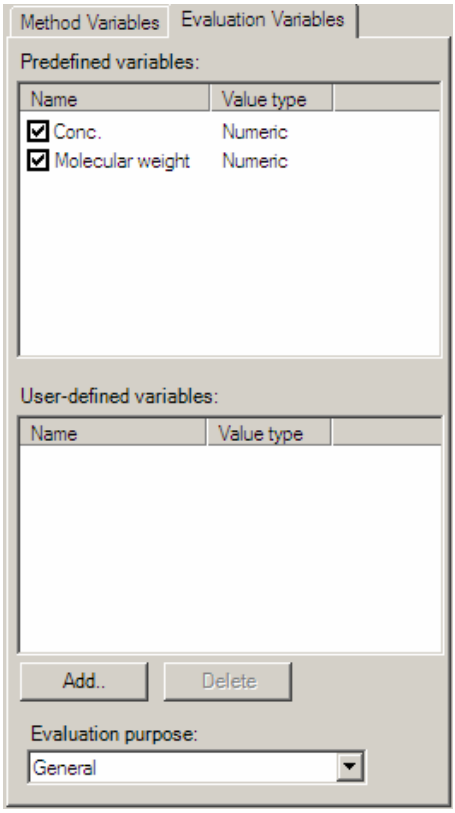
Regeneration solutions　：Flow cell1 , Flow cell2 , Flow cell3 , Flow cell4 の欄に再生溶液名を入力。
“10 mM NaOH”と入力する。

Contact time　：30

④ 各 Command の“variable”なパラメータ設定

Sample1



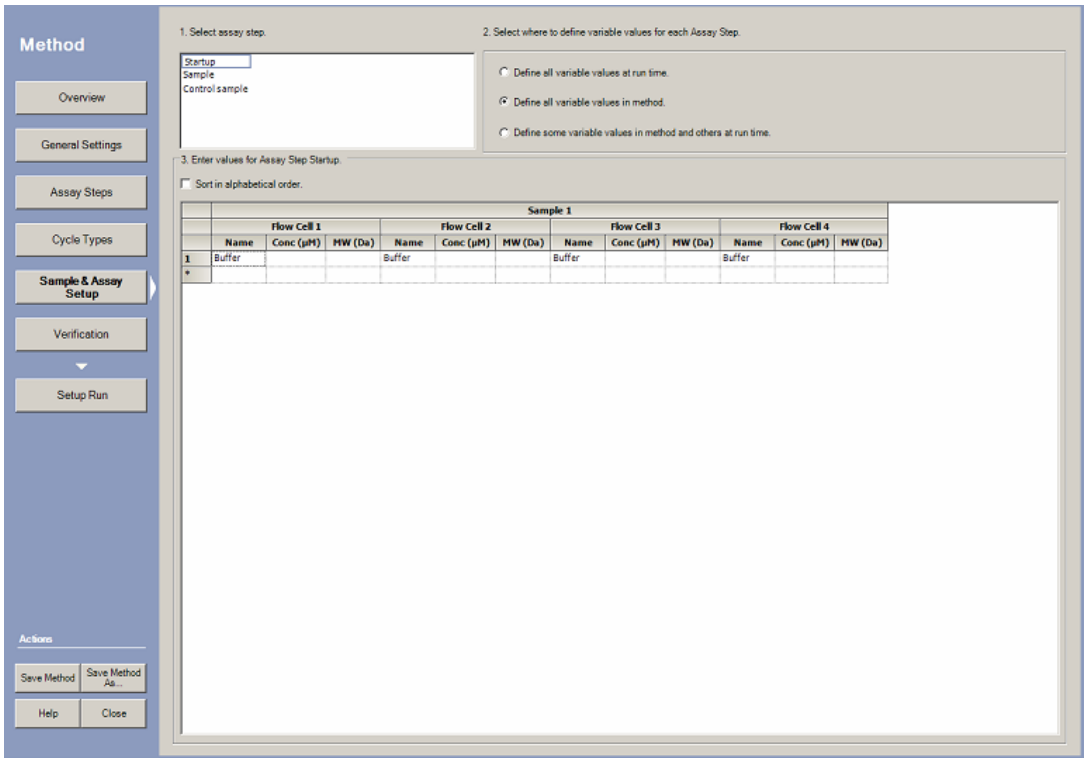


Evaluation variables は設定変更なし。

Sample & Assay Setup をクリックする。

↓

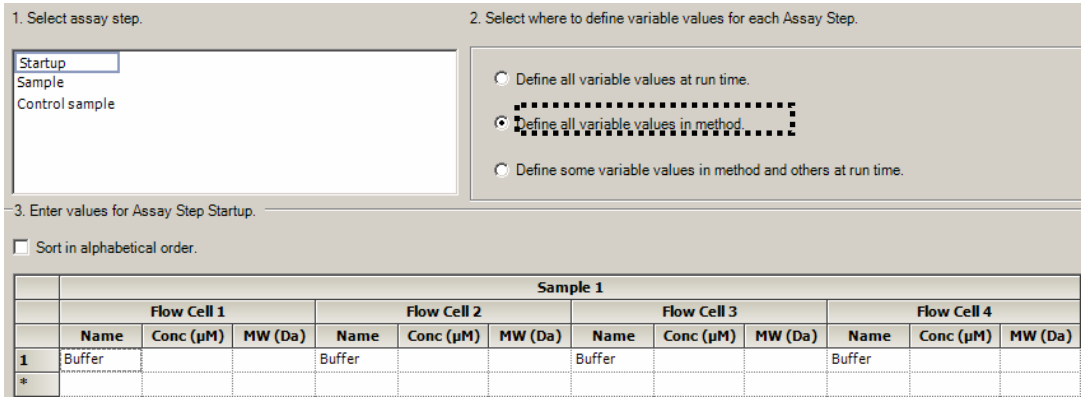
Sample & Assay Setup



各ステップにおける Variable なパラメータの入力方法について設定を行う。

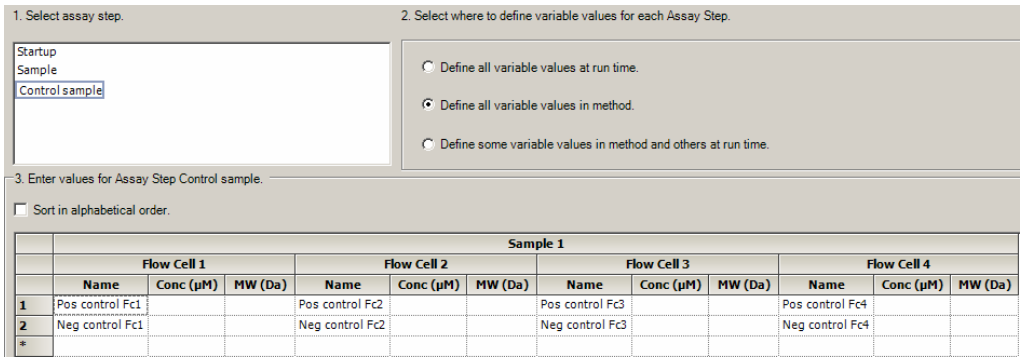
↓

Startup



Define all variable values in method にチェックを入れる。
各フローセルの **Name** に ”Buffer” と入力する。

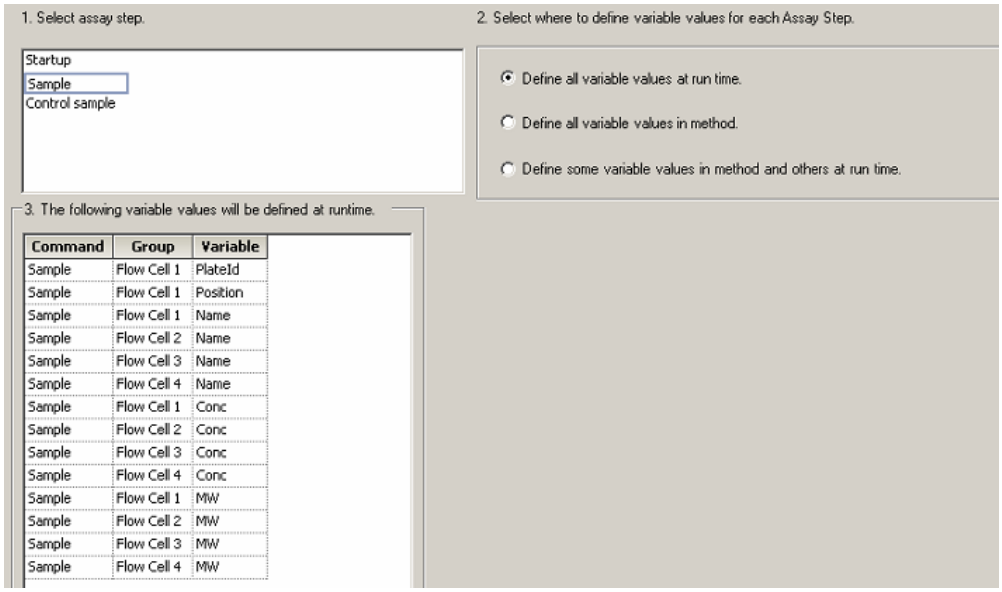
Control Sample


1. Select assay step.
2. Select where to define variable values for each Assay Step.
Startup
Sample
Control sample
Define all variable values at run time.
Define all variable values in method.
Define some variable values in method and others at run time.
3. Enter values for Assay Step Control sample.
Sort in alphabetical order.

	Sample 1											
	Flow Cell 1			Flow Cell 2			Flow Cell 3			Flow Cell 4		
	Name	Conc (µM)	MW (Da)	Name	Conc (µM)	MW (Da)	Name	Conc (µM)	MW (Da)	Name	Conc (µM)	MW (Da)
1	Pos control Fc1			Pos control Fc2			Pos control Fc3			Pos control Fc4		
2	Neg control Fc1			Neg control Fc2			Neg control Fc3			Neg control Fc4		
*												

Define all variable values in method にチェックを入れる。
各フローセルの **Name** にコントロールサンプル名を入力する。
Conc(µM)、**MW(Da)**の入力は任意。

Sample


1. Select assay step.
2. Select where to define variable values for each Assay Step.
Startup
Sample
Control sample
Define all variable values at run time.
Define all variable values in method.
Define some variable values in method and others at run time.
3. The following variable values will be defined at runtime.

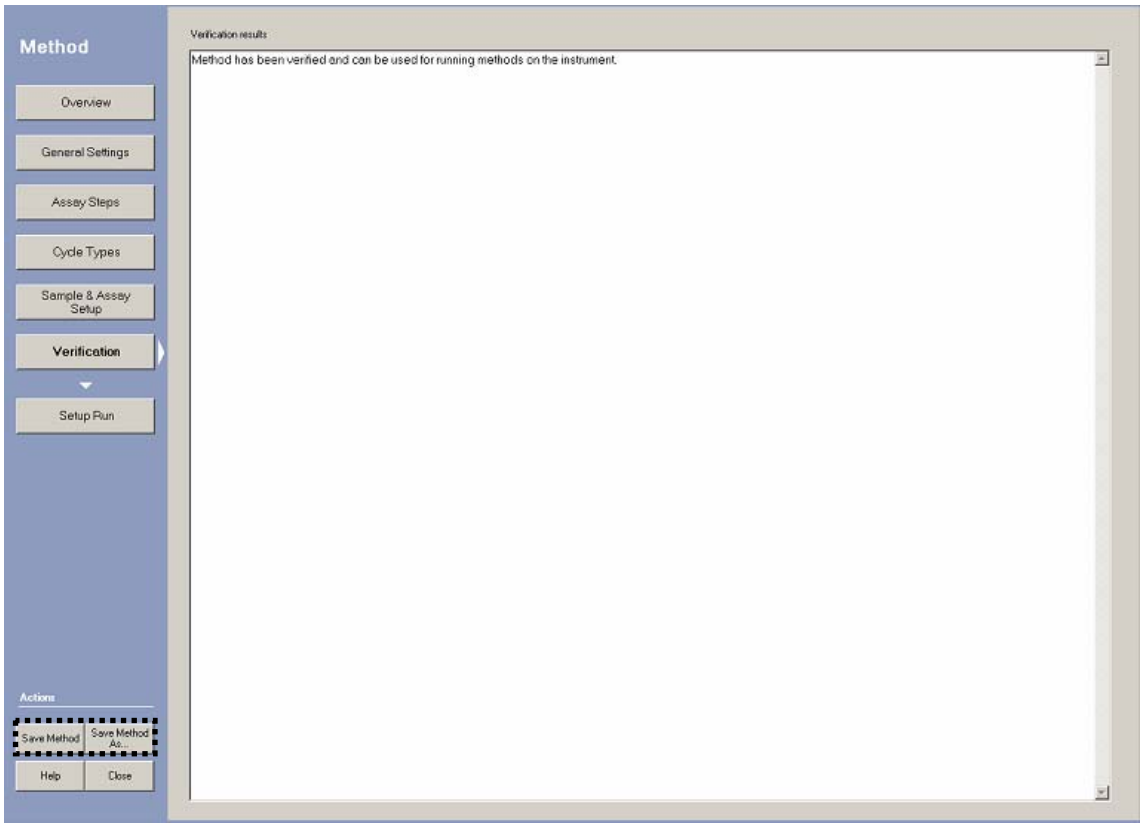
Command	Group	Variable
Sample	Flow Cell 1	PlateId
Sample	Flow Cell 1	Position
Sample	Flow Cell 1	Name
Sample	Flow Cell 2	Name
Sample	Flow Cell 3	Name
Sample	Flow Cell 4	Name
Sample	Flow Cell 1	Conc
Sample	Flow Cell 2	Conc
Sample	Flow Cell 3	Conc
Sample	Flow Cell 4	Conc
Sample	Flow Cell 1	MW
Sample	Flow Cell 2	MW
Sample	Flow Cell 3	MW
Sample	Flow Cell 4	MW

Define all variable values at run time にチェックを入れる。

Verification をクリックする。

↓

Verification



↓

ここまで作成したメソッドを保存する場合には **Save Method**、もしくは **Save Method As...**をクリックし、所定のフォルダにファイル名をつけて保存する。

↓

Setup Run をクリックする。

↓

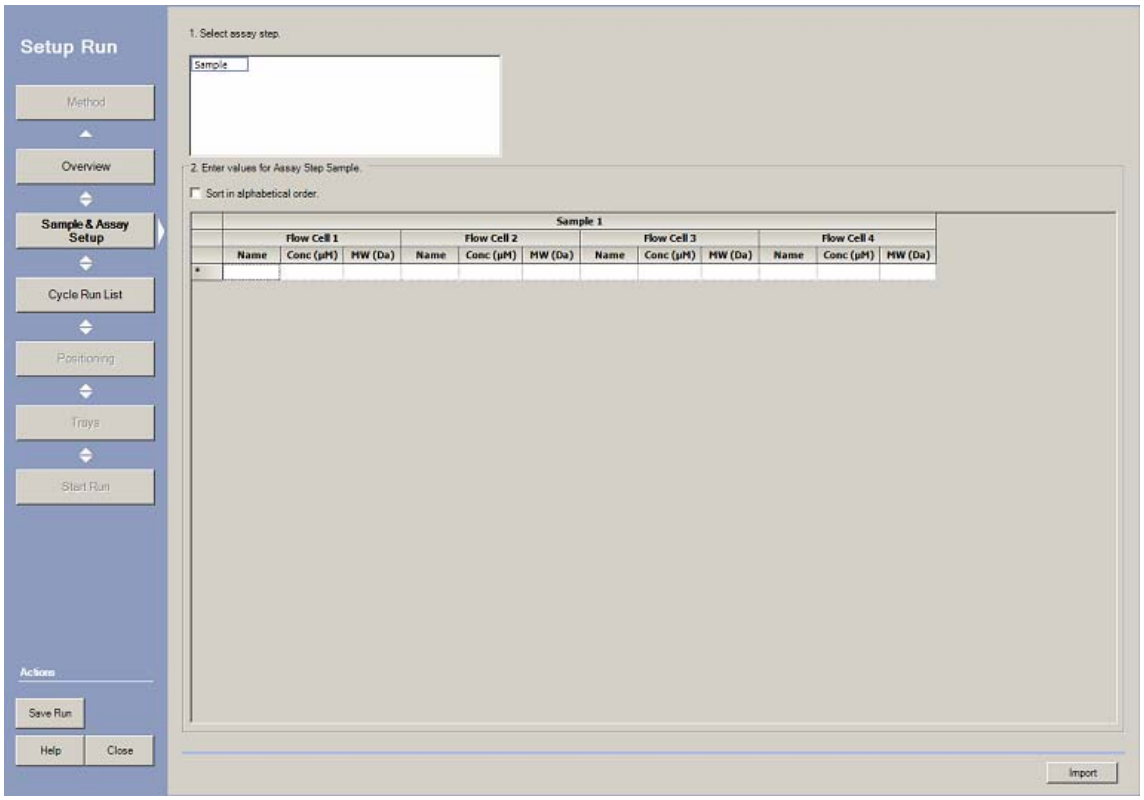
Overview で測定ステップを確認する。

↓

Sample & Assay Setup をクリックする。

↓

Sample & Assay Setup



サンプル情報を入力する。

↓

Cycle Run List をクリックする。

↓

Cycle	Assay step name	Sample Fc1	Sample Fc2	Sample Fc3	Sample Fc4	Conc Fc1	Conc Fc2	Conc Fc3	Conc Fc4	MW Fc1	MW Fc2	MW Fc3	MW
1	Startup	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer								
2	Startup	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer								
3	Startup	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer								
4	Control sample	Negative	Negative	Negative	Negative								
5	Control sample	Positive	Positive	Positive	Positive								
6	Sample	A1	A13	A25	A37	10	10	10	10				
7	Sample	A2	A14	A26	A38	10	10	10	10				
8	Sample	A3	A15	A27	A39	10	10	10	10				
9	Sample	A4	A16	A28	A40	10	10	10	10				
10	Sample	A5	A17	A29	A41	10	10	10	10				
11	Sample	A6	A18	A30	A42	10	10	10	10				
12	Sample	A7	A19	A31	A43	10	10	10	10				
13	Sample	A8	A20	A32	A44	10	10	10	10				
14	Sample	A9	A21	A33	A45	10	10	10	10				
15	Sample	A10	A22	A34	A46	10	10	10	10				
16	Sample	A11	A23	A35	A47	10	10	10	10				
17	Sample	A12	A24	A36	A48	10	10	10	10				
18	Sample	A49	A61	A73	A85	10	10	10	10				
19	Sample	A50	A62	A74	A86	10	10	10	10				
20	Sample	A51	A63	A75	A87	10	10	10	10				
21	Sample	A52	A64	A76	A88	10	10	10	10				
22	Sample	A53	A65	A77	A89	10	10	10	10				
23	Sample	A54	A66	A78	A90	10	10	10	10				
24	Sample	A55	A67	A79	A91	10	10	10	10				
25	Sample	A56	A68	A80	A92	10	10	10	10				
26	Control sample	Negative	Negative	Negative	Negative								
27	Control sample	Positive	Positive	Positive	Positive								
28	Sample	A57	A69	A81	A93	10	10	10	10				
29	Sample	A58	A70	A82	A94	10	10	10	10				

Startup（3 回）

Control Sample（2 回）

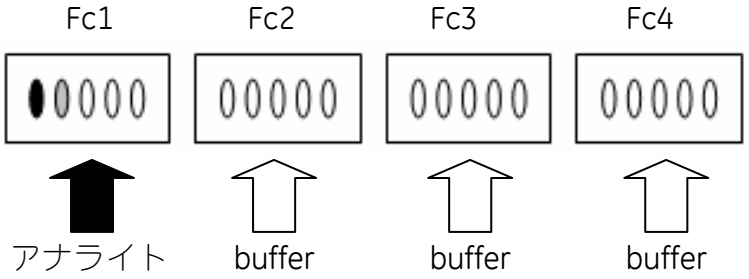
Sample（20 回）

Positioning→**Trays**→**StartRun** を順次クリックし測定を開始する。

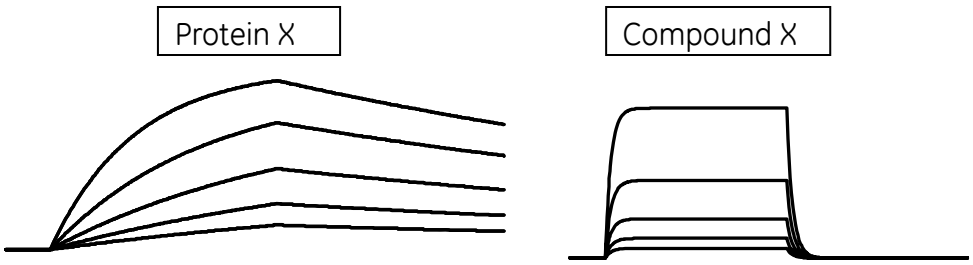
6-2.　反応速度定数・解離定数の算出

反応速度定数・解離定数算出用メソッドの作成について、一例を挙げて解説する。

＜測定例＞
フローセル 1 のスポット 1 と 2 に異なるリガンドを固定化し、スポット 3 をリファレンスとする。
2 種類のアナライトの濃度系列を順次添加する。



＜測定条件＞



結合：2 分間
解離：2 分間
再生：10mM NaOH 30 秒間

結合：1 分間
解離：1 分間
再生：なし

＜測定ステップ＞

Startup　：測定前にランニング緩衝液を 3 回添加する。
Sample series 1　：protein X の測定サイクル
Sample series 2　：Compound X の測定サイクル

＜メソッド例＞

New Method をクリックし、

Biacore Methods / Kinetics and affinity / Kinetics and affinity を選択し **OK** をクリックする。

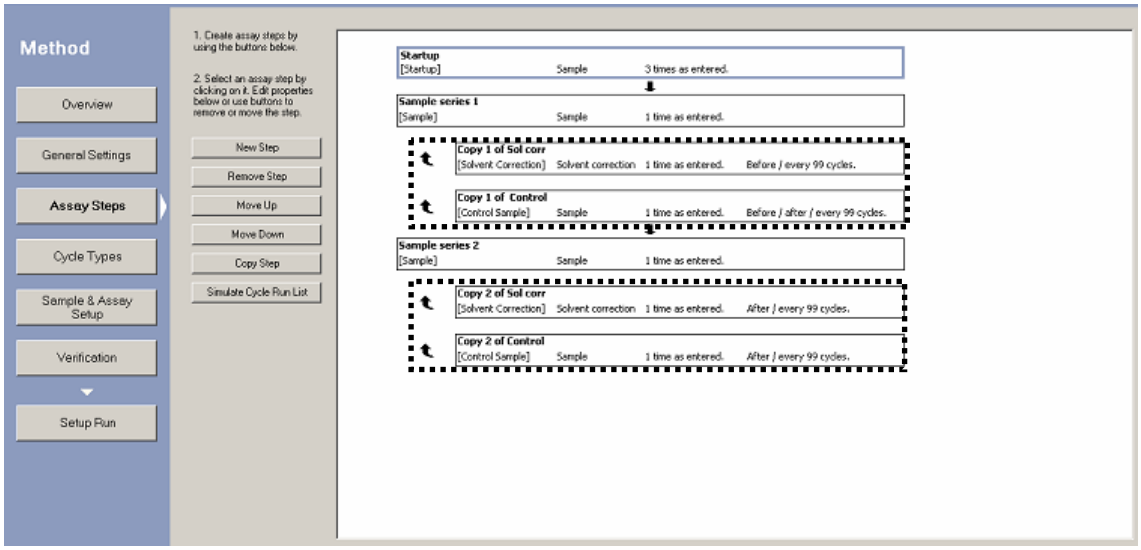
General Setting をクリックする。

↓

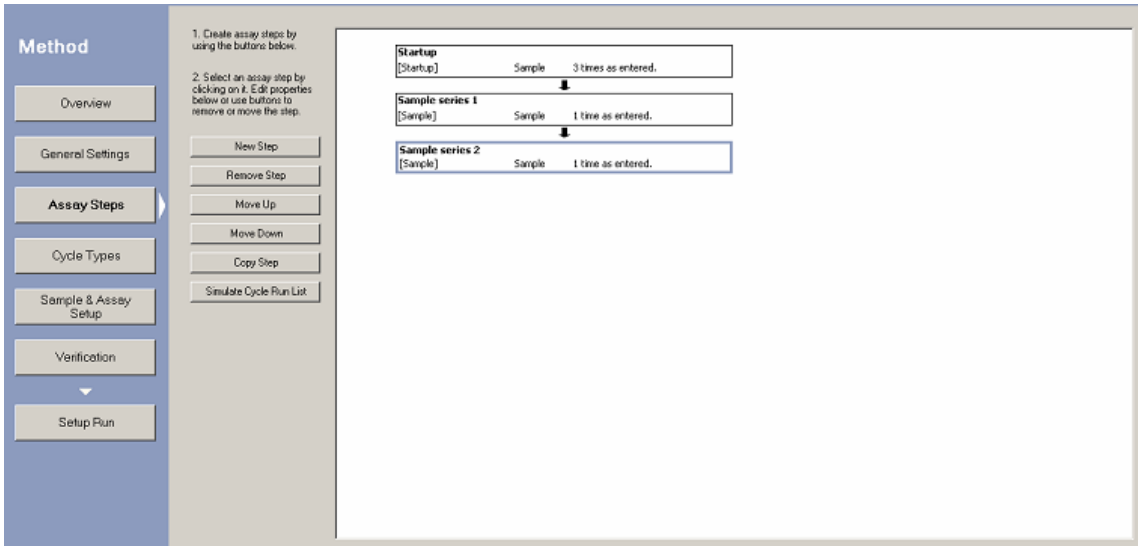
使用ランニング緩衝液、濃度単位(必ずモル濃度を選択すること)、サンプルプレート（96 ウェル)、温度を設定し **Assay Steps** をクリックする。

↓

Remove Step で下記点線ステップを削除する。


Method
Overview
General Settings
Assay Steps
Cycle Types
Sample & Assay Setup
Verification
Setup Run
1. Create assay steps by using the buttons below.
2. Select an assay step by clicking on it. Edit properties below or use buttons to remove or move the step.
New Step
Remove Step
Move Up
Move Down
Copy Step
Simulate Cycle Run List
Startup [Startup] Sample 3 times as entered.
Sample series 1 [Sample] Sample 1 time as entered.
Copy 1 of Sol corr [Solvent Correction] Solvent correction 1 time as entered. Before / every 99 cycles.
Copy 1 of Control [Control Sample] Sample 1 time as entered. Before / after / every 99 cycles.
Sample series 2 [Sample] Sample 1 time as entered.
Copy 2 of Sol corr [Solvent Correction] Solvent correction 1 time as entered. After / every 99 cycles.
Copy 2 of Control [Control Sample] Sample 1 time as entered. After / every 99 cycles.

↓

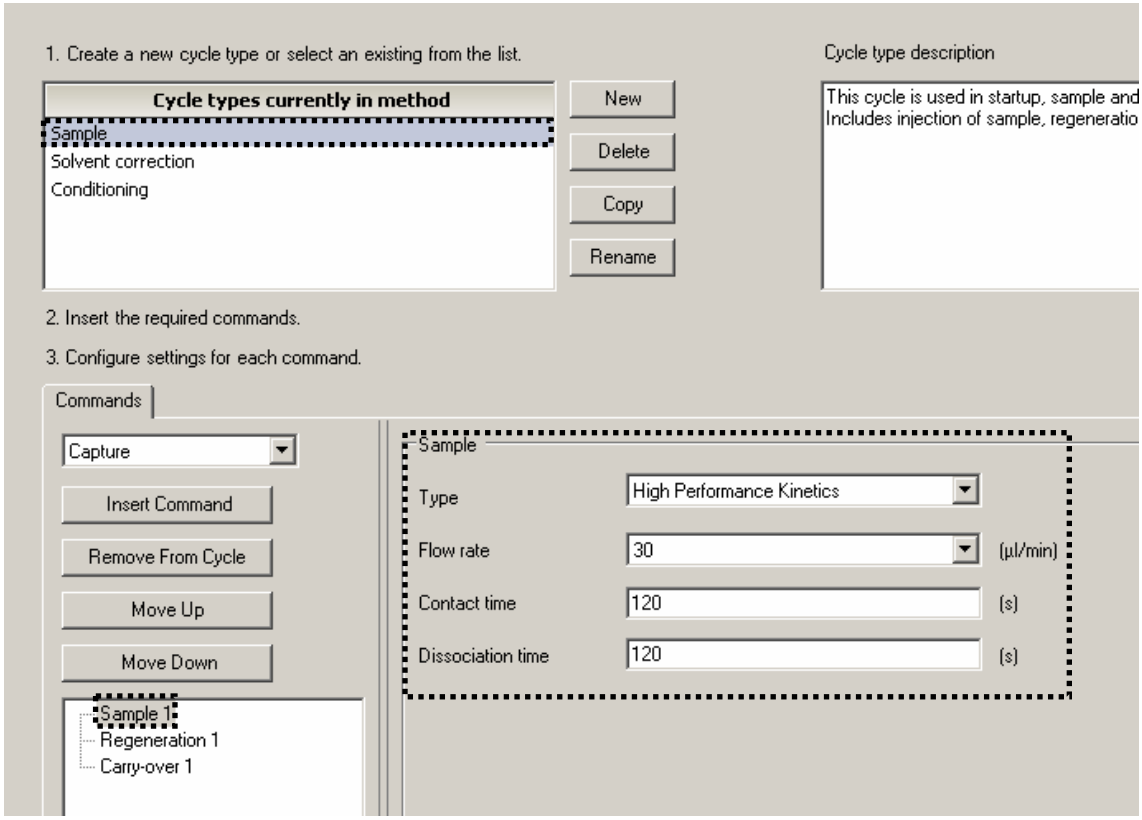

Method
Overview
General Settings
Assay Steps
Cycle Types
Sample & Assay Setup
Verification
Setup Run
1. Create assay steps by using the buttons below.
2. Select an assay step by clicking on it. Edit properties below or use buttons to remove or move the step.
New Step
Remove Step
Move Up
Move Down
Copy Step
Simulate Cycle Run List
Startup [Startup] Sample 3 times as entered.
Sample series 1 [Sample] Sample 1 time as entered.
Sample series 2 [Sample] Sample 1 time as entered.

Cycle Types をクリックする。

↓

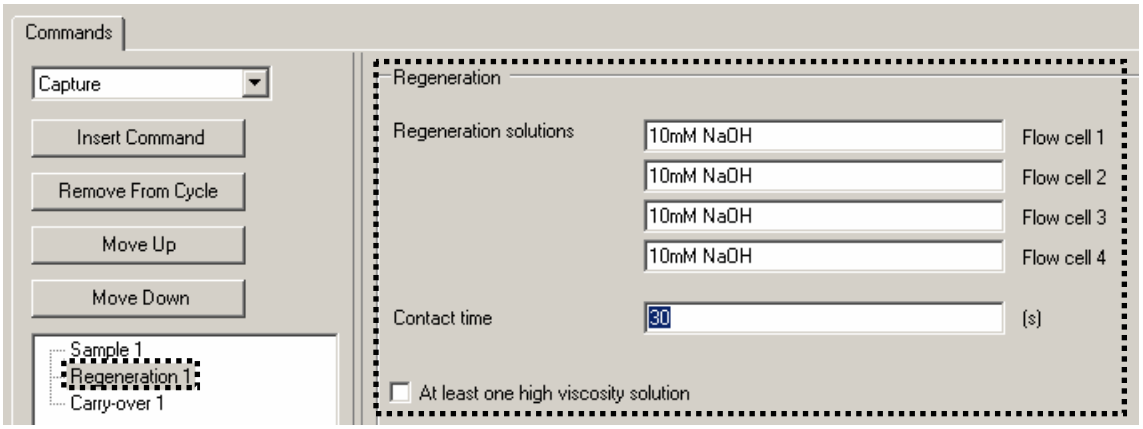
protein X の測定条件を設定する。

相互作用測定条件



Type　：High Performance Kinetics
Flow rate　：30
Contact time　：120
Dissociation time　：120

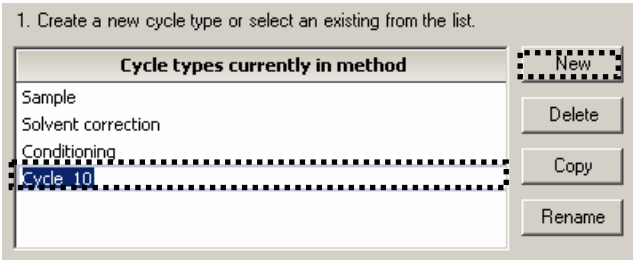
再生条件



Regeneration solutions　：10 mM NaOH
Contact time　：30

↓

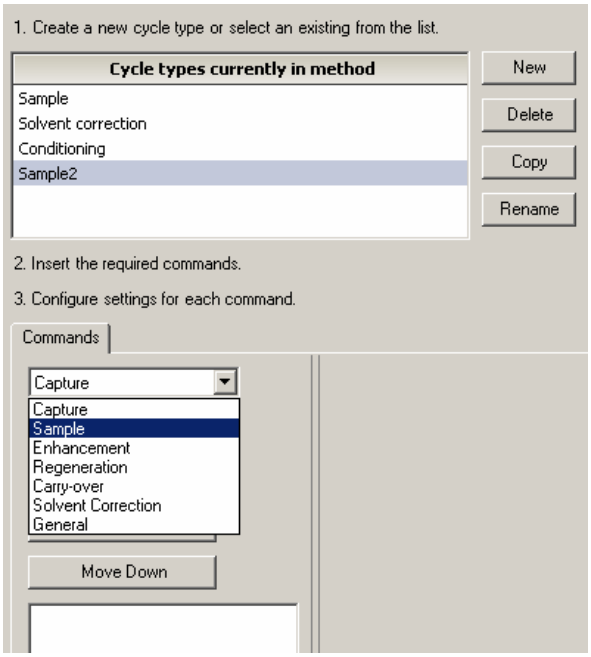
Compound X の測定条件を作成する。



Cycle types currently in method の **New** をクリックし**"Sample2"**と入力する。

↓

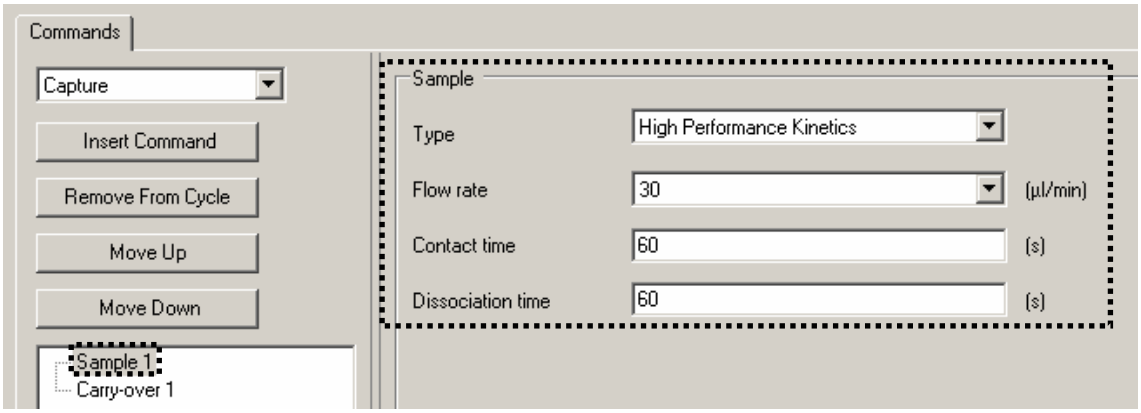
Sample2 の測定プロトコルを作成する。



Commands タブ中のプルダウンメニューから **Sample**、**Carry-over** を順次選択し **Insert Command** をクリックする。

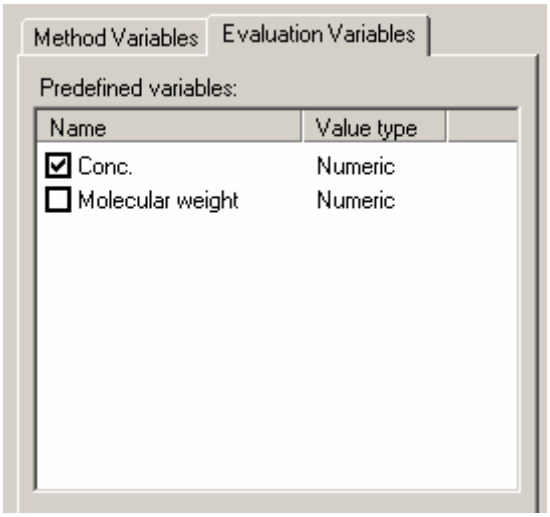
↓

サンプル添加条件を入力する。



Type　：High Performance Kinetics
Flow rate　：30
Contact time　：60
Dissociation time　：60

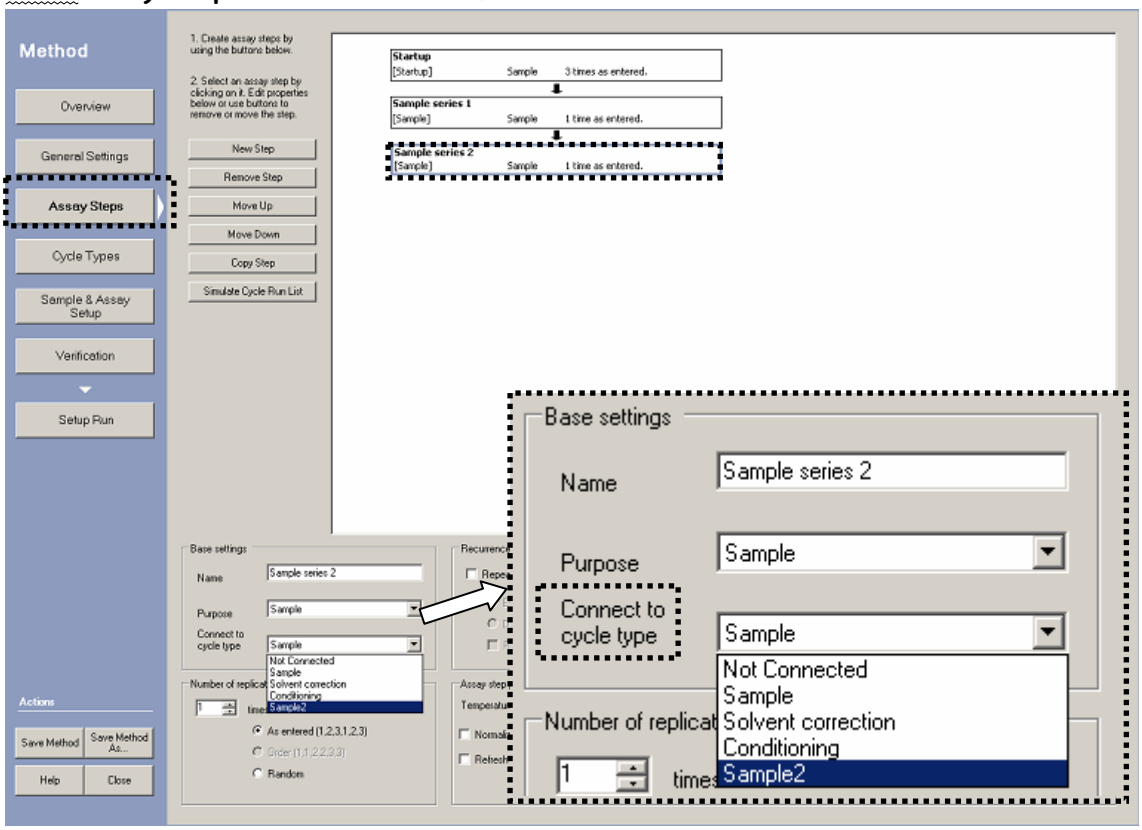
新たな **cycle type** を作成した場合には、必ず **Variable** パラメータの設定を行う。



Evaluation Variables の **Conc.**にチェックを入れる。

↓

再度 **Assay Steps** をクリックする。



Assay Steps の **Sample series 2** を選択する。

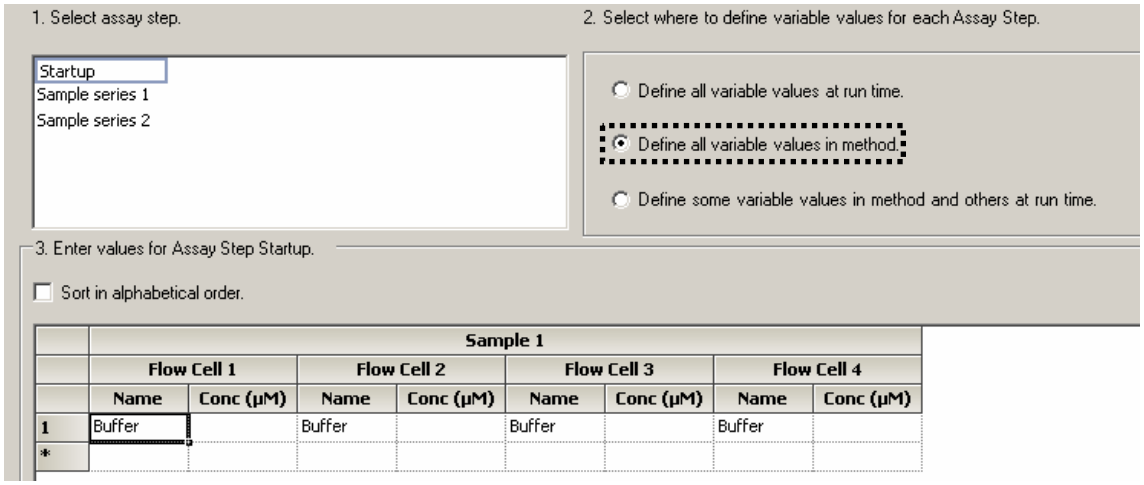
Base settings の **Connect to cycle type** から **Sample2** を選択する。

↓

Sample & Assay Setup をクリックする。

↓

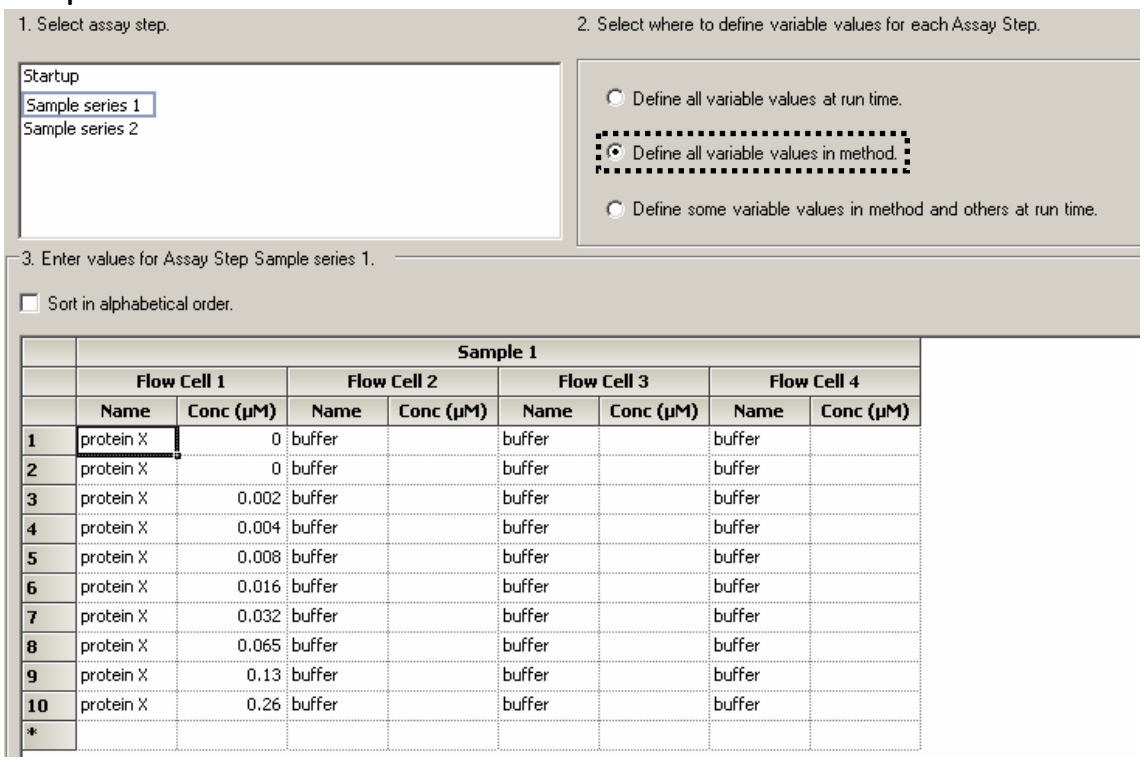
Startup


1. Select assay step.
2. Select where to define variable values for each Assay Step.
Startup
Sample series 1
Sample series 2
Define all variable values at run time.
Define all variable values in method.
Define some variable values in method and others at run time.
3. Enter values for Assay Step Startup.
Sort in alphabetical order.

	Sample 1							
	Flow Cell 1		Flow Cell 2		Flow Cell 3		Flow Cell 4	
	Name	Conc (µM)	Name	Conc (µM)	Name	Conc (µM)	Name	Conc (µM)
1	Buffer		Buffer		Buffer		Buffer	
*								

Define all values in method にチェックを入れる。
各フローセルの **Name** に"Buffer"と入力する。

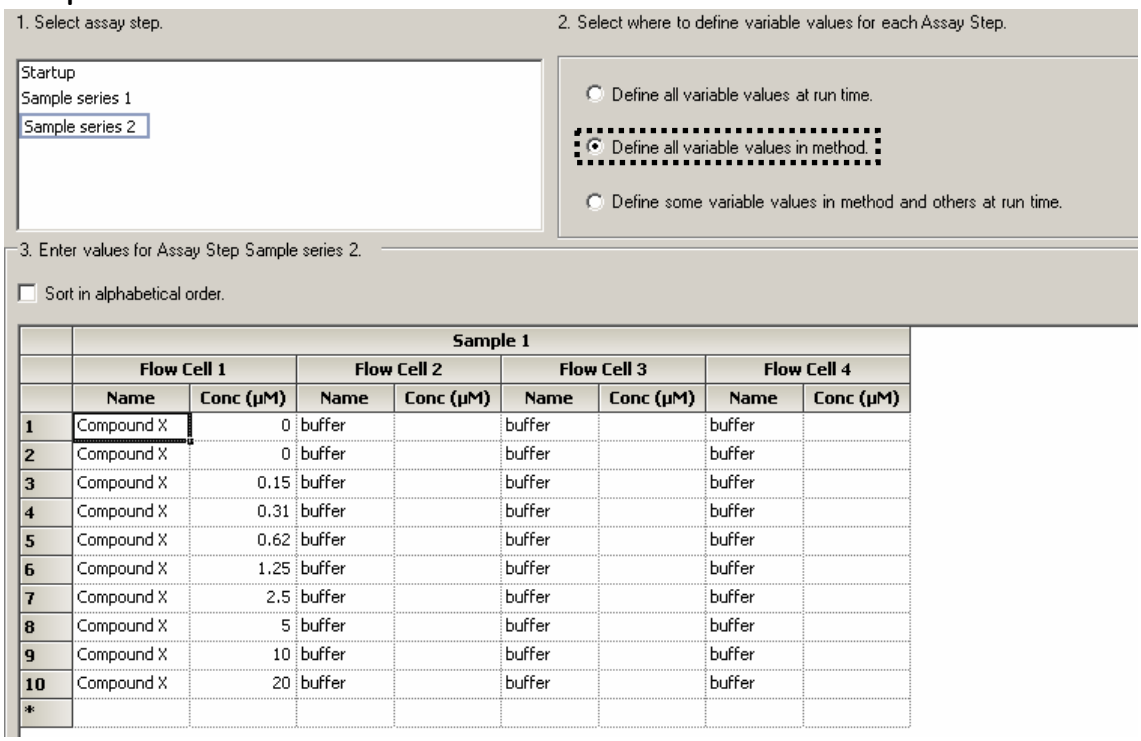
Sample series 1


1. Select assay step.
2. Select where to define variable values for each Assay Step.
Startup
Sample series 1
Sample series 2
Define all variable values at run time.
Define all variable values in method.
Define some variable values in method and others at run time.
3. Enter values for Assay Step Sample series 1.
Sort in alphabetical order.

	Sample 1							
	Flow Cell 1		Flow Cell 2		Flow Cell 3		Flow Cell 4	
	Name	Conc (µM)	Name	Conc (µM)	Name	Conc (µM)	Name	Conc (µM)
1	protein X	0	buffer		buffer		buffer	
2	protein X	0	buffer		buffer		buffer	
3	protein X	0.002	buffer		buffer		buffer	
4	protein X	0.004	buffer		buffer		buffer	
5	protein X	0.008	buffer		buffer		buffer	
6	protein X	0.016	buffer		buffer		buffer	
7	protein X	0.032	buffer		buffer		buffer	
8	protein X	0.065	buffer		buffer		buffer	
9	protein X	0.13	buffer		buffer		buffer	
10	protein X	0.26	buffer		buffer		buffer	
*								

Define all variable values in method にチェックを入れる。
各フローセルの **Name** と **Conc(µM)**を入力する。使用しない Flow Cell2～4 の **Name** は"buffer"と入力し、**Conc(µM)**は空欄にしておく。

Sample series 2


1. Select assay step.
Startup
Sample series 1
Sample series 2
2. Select where to define variable values for each Assay Step.
Define all variable values at run time.
Define all variable values in method.
Define some variable values in method and others at run time.
3. Enter values for Assay Step Sample series 2.
Sort in alphabetical order.

	Sample 1							
	Flow Cell 1		Flow Cell 2		Flow Cell 3		Flow Cell 4	
	Name	Conc (µM)	Name	Conc (µM)	Name	Conc (µM)	Name	Conc (µM)
1	Compound X	0	buffer		buffer		buffer	
2	Compound X	0	buffer		buffer		buffer	
3	Compound X	0.15	buffer		buffer		buffer	
4	Compound X	0.31	buffer		buffer		buffer	
5	Compound X	0.62	buffer		buffer		buffer	
6	Compound X	1.25	buffer		buffer		buffer	
7	Compound X	2.5	buffer		buffer		buffer	
8	Compound X	5	buffer		buffer		buffer	
9	Compound X	10	buffer		buffer		buffer	
10	Compound X	20	buffer		buffer		buffer	
*								

Sample series1 と同様に入力する。

↓

Verification→Setup Run→Samples & Assay Setup→Cycle Run List
を順次クリックする。

Cycle Run List

Cycle	Assay step name	Sample Fc1	Sample Fc2	Sample Fc3	Sample Fc4	Conc Fc1	Conc Fc2	Conc Fc3	Conc Fc4
1	Startup	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer				
2	Startup	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer				
3	Startup	Buffer	Buffer	Buffer	Buffer				
4	Sample series 1	protein X	buffer	buffer	buffer	0			
5	Sample series 1	protein X	buffer	buffer	buffer	0			
6	Sample series 1	protein X	buffer	buffer	buffer	0.002			
7	Sample series 1	protein X	buffer	buffer	buffer	0.004			
8	Sample series 1	protein X	buffer	buffer	buffer	0.008			
9	Sample series 1	protein X	buffer	buffer	buffer	0.016			
10	Sample series 1	protein X	buffer	buffer	buffer	0.032			
11	Sample series 1	protein X	buffer	buffer	buffer	0.065			
12	Sample series 1	protein X	buffer	buffer	buffer	0.13			
13	Sample series 1	protein X	buffer	buffer	buffer	0.26			
14	Sample series 2	Compound X	buffer	buffer	buffer	0			
15	Sample series 2	Compound X	buffer	buffer	buffer	0			
16	Sample series 2	Compound X	buffer	buffer	buffer	0.15			
17	Sample series 2	Compound X	buffer	buffer	buffer	0.31			
18	Sample series 2	Compound X	buffer	buffer	buffer	0.62			
19	Sample series 2	Compound X	buffer	buffer	buffer	1.25			
20	Sample series 2	Compound X	buffer	buffer	buffer	2.5			
21	Sample series 2	Compound X	buffer	buffer	buffer	5			
22	Sample series 2	Compound X	buffer	buffer	buffer	10			
23	Sample series 2	Compound X	buffer	buffer	buffer	20			

Protein X の測定

Compound X の測定

↓

Positioning→Trays→StartRun を順次クリックし測定を開始する。

6-3. 低分子化合物アナライトを測定する際の注意事項

ランニング緩衝液

低分子化合物測定のランニング緩衝液には、DMSO 含有 PBS や HEPES を使用することが多い。血清アルブミンとの結合を測定する場合には HEPES 成分が血清アルブミンに結合するとの報告があるため PBS を用いる。
キナーゼ等の酵素をリガンドにする場合は、エンザイムアッセイ等で用いる緩衝液組成を選択するのも手である。
添加する DMSO 濃度は 5 %程度を推奨するが最終的な DMSO 濃度はリガンドの活性や化合物の溶解性を考慮し決定する。ランニング緩衝液に使用できる濃度はマイクロ流路系の化学耐性から 10 %が上限である。
また、DMSO は様々なグレードが市販されている。DMSO 溶液中の混合物が測定に影響を及ぼす場合があるのでグレードの高いもの(UV spectrometry 用等)を使用することを推奨する。

（注意）
PBS 10X バッファー（0.1 M phosphate buffer, 27 mM KCl, 1.37 M NaCl,
1 x 1000 ml,　BR-1006-72）を使用する場合
⇒超純水で 10 倍希釈後、DMSO を加える。
0.01 M phosphate buffer, 2.7 mM KCl, 0.137 M NaCl, 5% DMSO, pH 7.4
ランニング緩衝液は用事調製する。

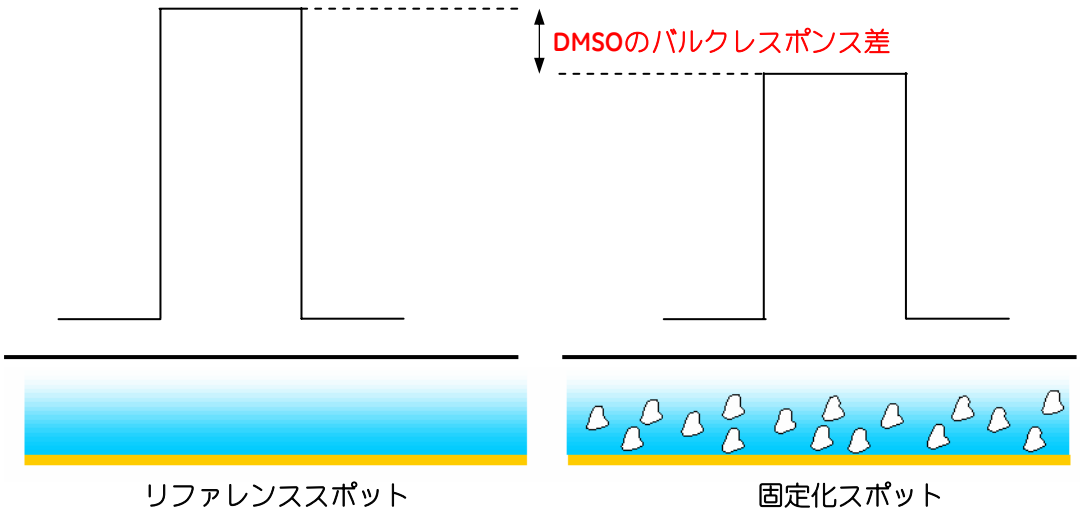
- DMSO を含む緩衝液をろ過する際には、フッ素樹脂製またはナイロン製のフィルターを用いる。酢酸セルロース製のものは避ける。
- 緩衝液はきれいなガラスボトルに保存し、装置にセットする直前までキャップはしっかり閉めておく。
- 緩衝液を装置のボトルポジションにセットする際は、蒸発や異物の混入を防ぐために必ず付属のキャップを使用する。

溶媒補正 (Solvent Correction)

相互作用のレスポンスはセンサー表面での結合反応だけでなく、ランニング緩衝液とサンプルを溶解している溶媒の屈折率の差、"**溶媒（バルク）効果**"のレスポンス（**バルクレスポンス**）が含まれる。

溶媒効果が小さい（100RU 以下）実験では、リガンド固定化スポットからリファレンススポットのレスポンスを差し引くだけでこのバルクレスポンスは排除できる。しかし厳密には、リガンド固定化スポットに添加した溶液は、リガンド分子の占有体積分排除されるため（下図）、リガンド固定化スポットのバルクレスポンスとリファレンススポットのバルクレスポンスの大きさは異なる。

バルクレスポンスが大きい DMSO を用いる低分子化合物の実験では、単純に差し引くだけではバルクレスポンスの差を十分に排除することはできない。実際、このバルクレスポンスの差は小さいが、低分子化合物が結合した際に得られる結合レスポンスと同程度である。



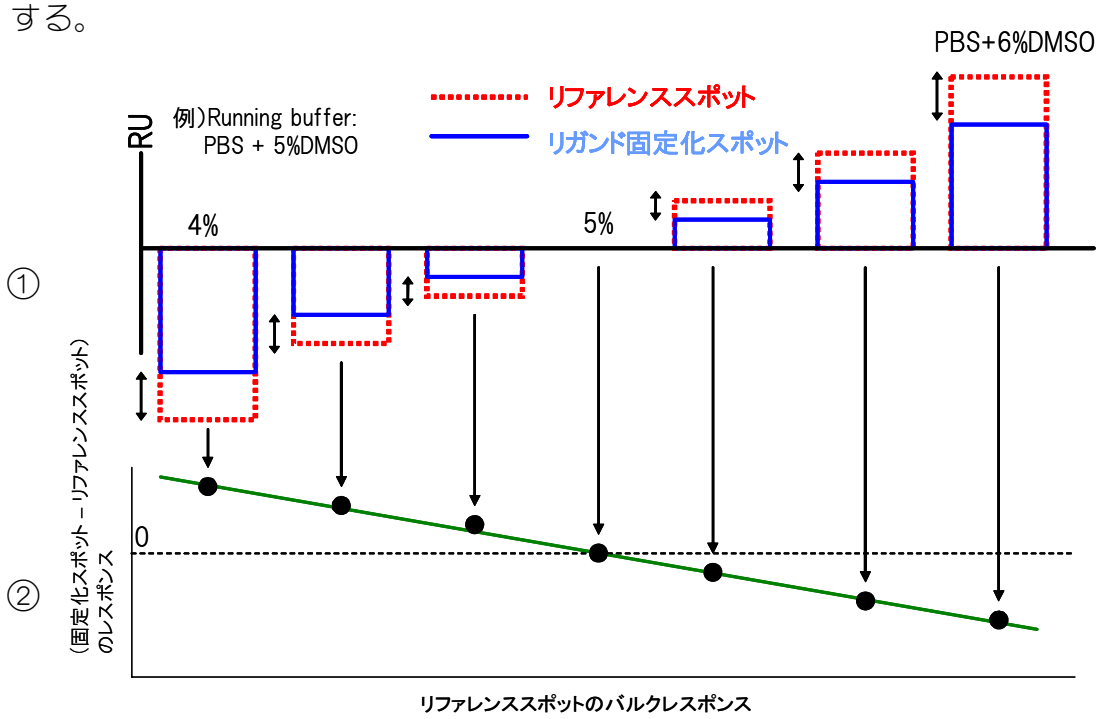
よってこのバルクレスポンスの差を補正する必要がある。これを**溶媒補正**という。

溶媒補正の手順

Biacore A100 では以下の溶媒補正操作を自動で行うことができる。

①DMSO 溶液の濃度系列（溶媒補正用 DMSO 溶液）を調製してフローセルに添加する。固定化スポットとリファレンススポットのバルクレスポンスの差を記録する。

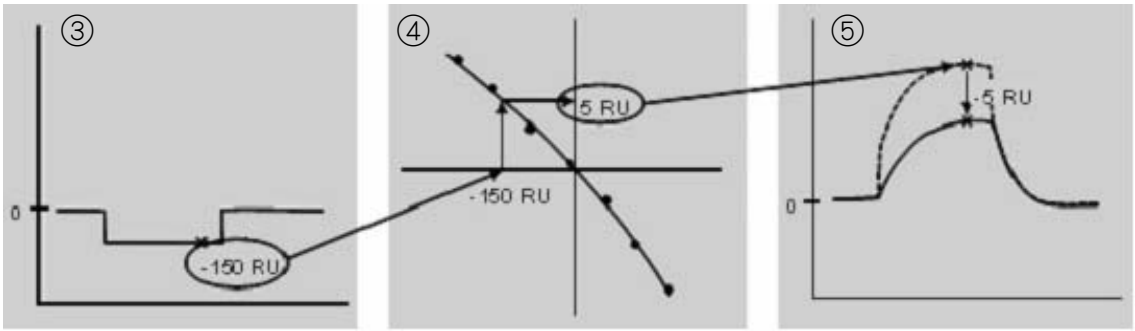
②リファレンススポットのバルクレスポンスを x 軸、固定化スポットとリファレンススポットのバルクレスポンスの差を y 軸にプロットして検量線を作成する。



③低分子化合物を添加した際のリファレンススポットのバルクレスポンスを求める。

④リファレンススポットのバルクレスポンスを検量線に代入し補正係数を算出する。

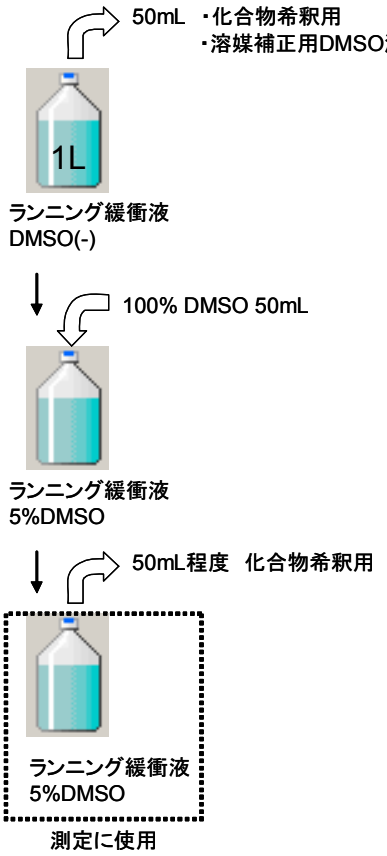
⑤相互作用測定で得られた結合レスポンスから補正係数を差し引く。



ランニング緩衝液、溶媒補正用 DMSO 溶液、化合物の調製

ランニング緩衝液の DMSO 濃度を 5%にする場合の各溶液の調製方法について解説する。検量線作成範囲は通常含有 DMSO 濃度に対して±1%程度の溶液を使用する。すべての DMSO 溶液は用事調製する。

ランニング緩衝液の調製例



溶媒補正用 DMSO 溶液の調製例

4% DMSO ストック溶液

ランニング緩衝液 DMSO(-)	9.6ml
100% DMSO	0.4ml
	10ml

6% DMSO ストック溶液

ランニング緩衝液 DMSO(-)	9.4ml
100% DMSO	0.6ml
	10ml

上記溶液を混合し 4%～6%の溶液を調製する。

下表は 8 段階の調製例である。

4%DMSO		200	400	600	800	1000	1200	1400 (ul)
6%DMSO	1400	1200	1000	800	600	400	200	

化合物の調製例

化合物10mM in 100%DMSO

↓ ×20 ランニング緩衝液DMSO(-)

500uM in ランニング緩衝液 5%DMSO

↓ ×50 ランニング緩衝液 5%DMSO

10uM in ランニング緩衝液 5%DMSO

＊ 上記方法で析出する場合には 100% DMSO で可能な限り希釈し最終ステップでランニング緩衝液 DMSO(-)で希釈する方法を検討してみる。

（注意）

- DMSO はプラスチック容器に保存しない。
- DMSO を含む溶液を取り扱う際は、DMSO 耐性材質の容器を使用する。
- DMSO を含む溶液をろ過する際には、フッ素樹脂製またはナイロン製のろ過膜を使用する。酢酸セルロース製の膜は使用しない。

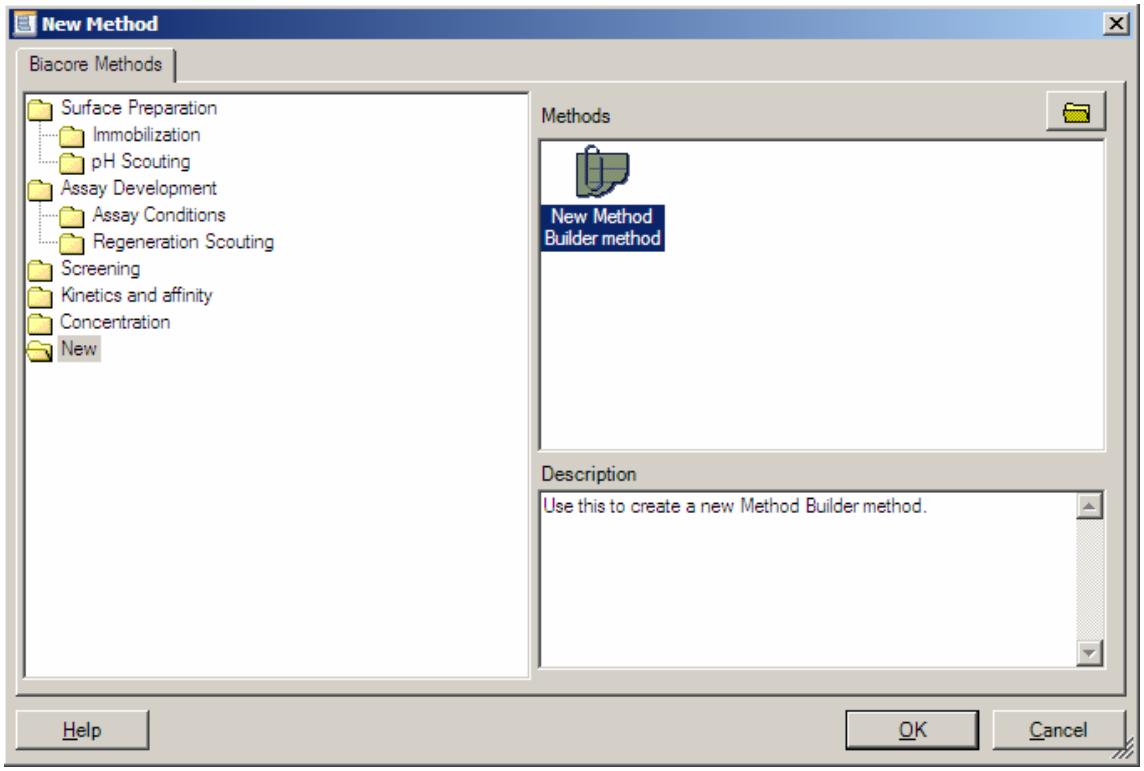
6-3-1　溶媒補正用 DMSO 溶液の確認

調製した溶媒補正用 DMSO 溶液のうち最大濃度と最小濃度の 2 点を測定し、それぞれ正と負のバルクレスポンスが得られることを確認する。
測定前に DMSO 含有ランニング緩衝液に交換する。

ナビゲーションパネルの Action から **New Method** をクリックする。

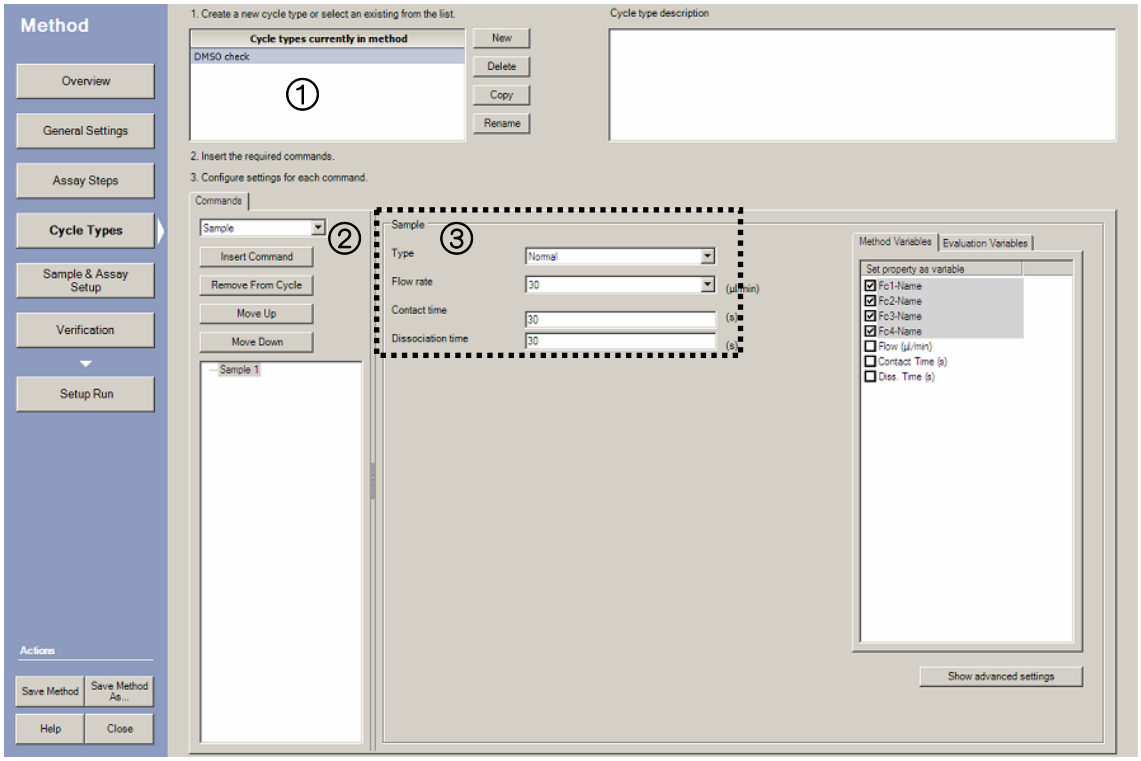
↓

New / New Method Builder method を選択し **OK** をクリックする。



ナビゲーションパネルの **Cycle Types** をクリックする。

↓



① デフォルト表示"Cycle_1"を"DMSO check"に書き換える。

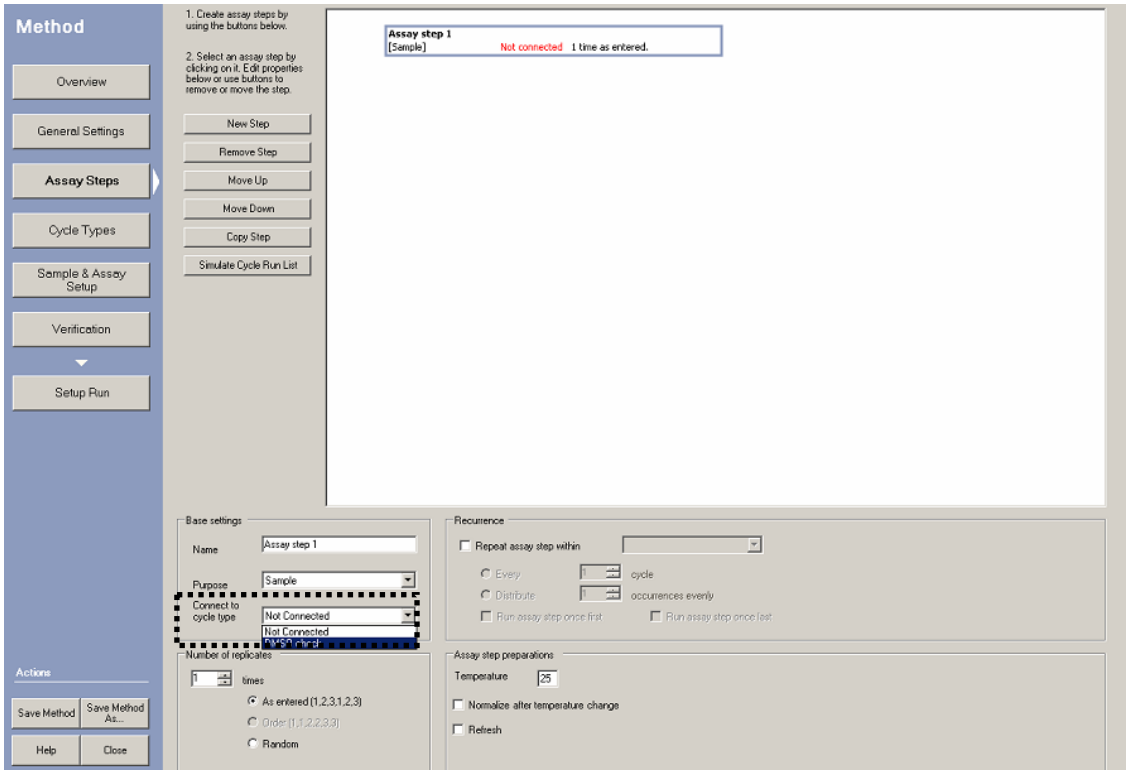
② プルダウンメニューから Sample を選択し、**Insert Command** をクリックする。
空欄に"Sample1"と表示される。

③ 測定条件を入力する。

Type	：Normal
Flow rate	：30
Contact time	：30
Dissociation time	：30

↓

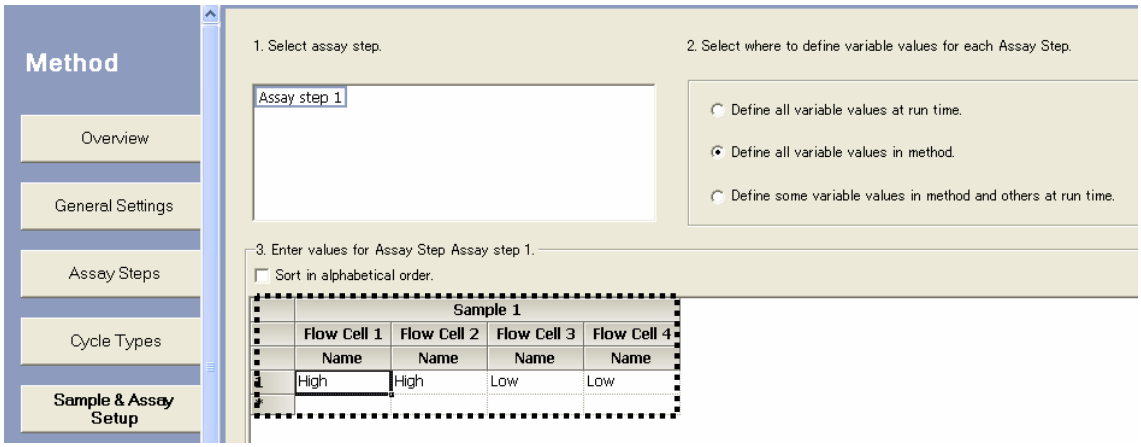
ナビゲーションパネルの **Assay Steps** をクリックする。



Connect to cycle type から **DMSO check** を選択する。

↓

ナビゲーションパネルの **Sample & Assay Setup** をクリックする。

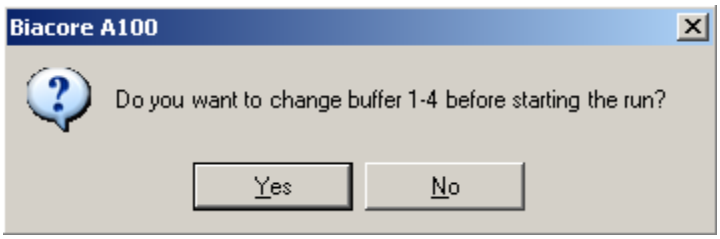


各フローセル 1，2 の Name に”High”、フローセル 3，4 に”Low ”と入力する。

↓

Verification→Setup Run→Sample & Assay Setup→Cycle Run List

↓



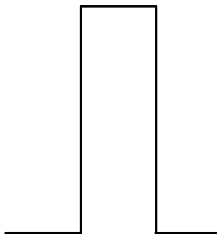
ランニング緩衝液を交換するため **Yes** をクリックする。

↓

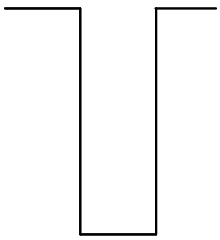
Positioning→Trays→Start Run の順でクリックし測定を開始する。

＜結果の評価＞

Flow cell1、2 のセンサーグラムが正のバルクレスポンスになることを確認する。



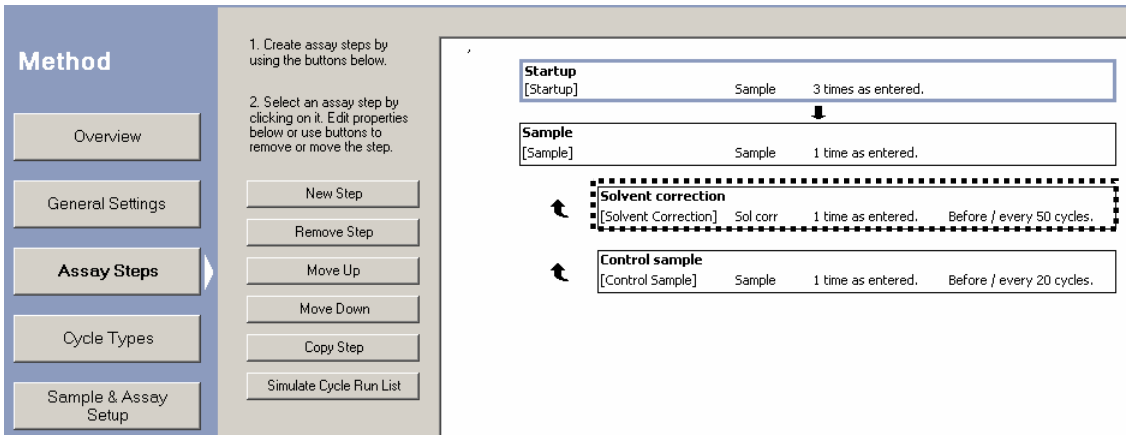
Flow cell3、4 のセンサーグラムが負のバルクレスポンスになることを確認する。



両方とも正、あるいは負になった場合には溶媒補正用 DMSO 溶液の調製ミスかランニング緩衝液の調製ミスが考えられる。再調製する必要がある。

6-3-2　溶媒補正ステップの設定

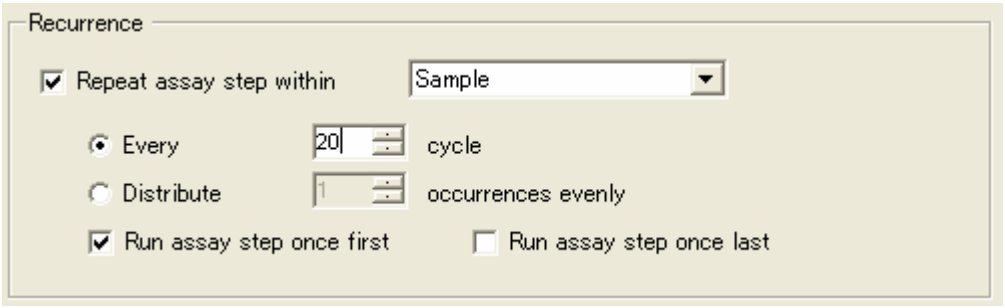
Screening および Kinetics and affinity のメソッドには予め溶媒補正のステップが組み込まれている。


Method
Overview
General Settings
Assay Steps
Cycle Types
Sample & Assay Setup
1. Create assay steps by using the buttons below.
2. Select an assay step by clicking on it. Edit properties below or use buttons to remove or move the step.
New Step
Remove Step
Move Up
Move Down
Copy Step
Simulate Cycle Run List
Startup
[Startup] Sample 3 times as entered.
Sample
[Sample] Sample 1 time as entered.
Solvent correction
[Solvent Correction] Sol corr 1 time as entered. Before / every 50 cycles.
Control sample
[Control Sample] Sample 1 time as entered. Before / every 20 cycles.

Assay Steps で **Solvent correction** を選択する。

↓

Recurrence で測定頻度を設定する。



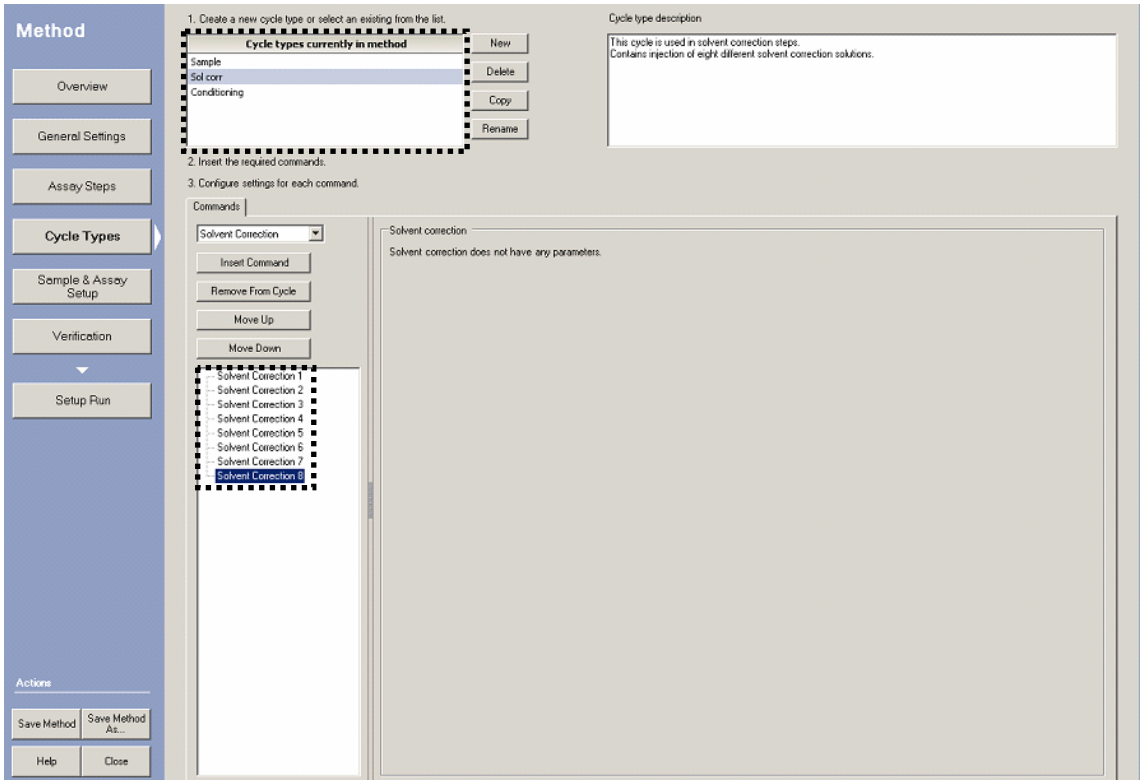
頻度の目安は 20 サイクルごと。

↓

Cycle Types をクリックする。

↓

Cycle types currently in method の **Sol corr** を選択する。



デフォルトは 8 点測定する設定になっている。

7. メンテナンス

システムのメンテナンスは既定のメンテナンスプログラムを実行することで行う。

メンテナンスに必要な試薬

通常のメンテナンスに必要な試薬は、Biacore Maintenance Kit, type 2（BR-1006-51）に含まれている。

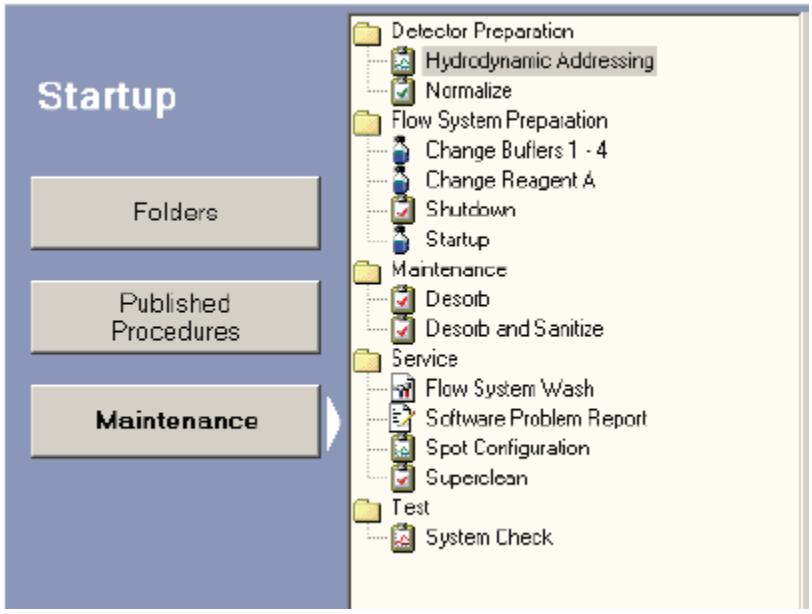
内容；

95 ml x 2	BIAdesorb solution 1
95 ml x 2	BIAdesorb solution 2
65 ml	BIAtest solution in HBS-N
10 ml x 3	BIAdisinfectant solution (conc.)
90 ml	BIAnormalizing solution
50 ml	HBS-N buffer 10X
1 枚	Sensor Chip Maintenance

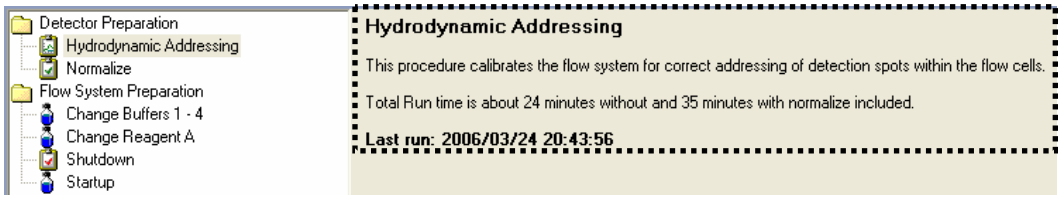
メンテナンス操作

ナビゲーションパネルの **Maintenance** をクリックする。

↓



各コマンドを選択すると作業内容、所要時間、前回実施した日時が表示される。



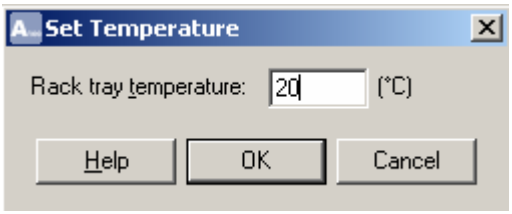
7-1. 日常のメンテナンス

7-1-1. Desorb

マイクロ流路系および、オートサンプラーチューブに付着した汚れ等を洗浄する操作。所要時間約 20 分間。実施頻度は週 1 回が目安。
測定温度 20℃以上で行う。
ラックホテル内の温度を 20℃以下に設定している場合には
Toolbar の **Rack Tray Temp.**アイコン （

） をクリックする。

↓

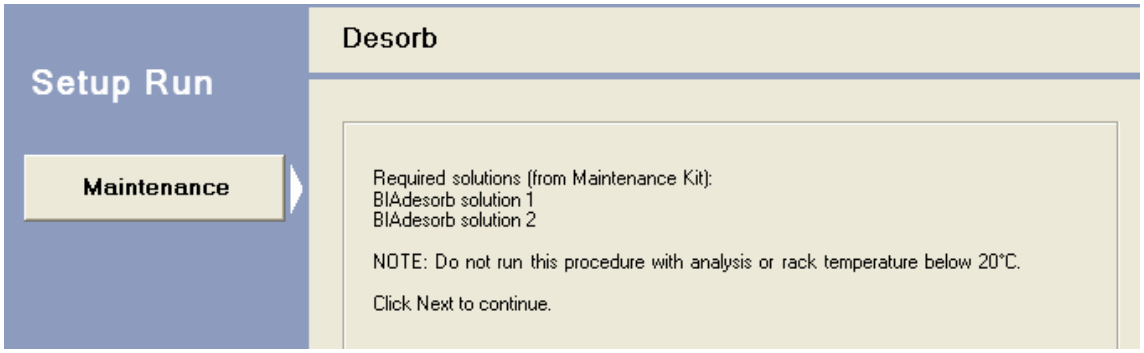


設定温度を 20℃以上に変更し **OK** をクリックする。設定温度に到達した後操作を実施する。

＊ 必要な試薬
・BIAdesorb solution 1（0.5 % SDS）
・BIAdesorb solution 2（50 mM Gly-NaOH、pH 9.5）
＊ランニング緩衝液： 超純水
●BIAdesorb solution 1 は 4℃で保存すると結晶が析出するので室温保存（その他のキット試薬は 4℃保存）。

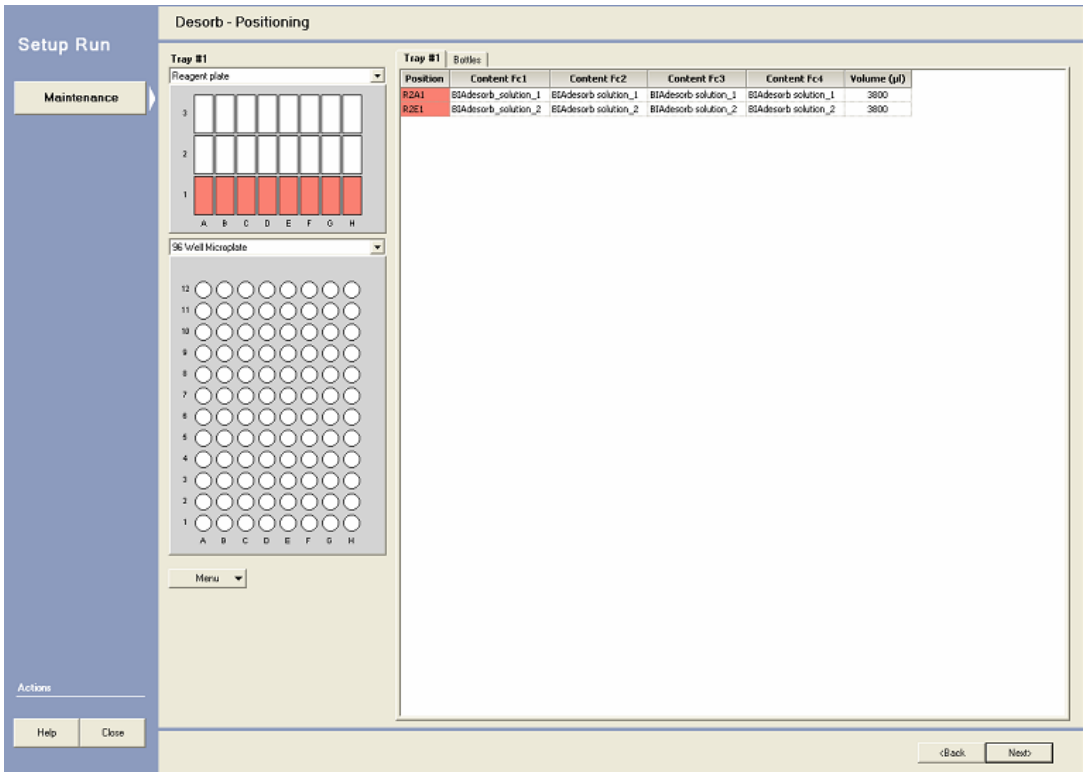
Desorb を選択してダブルクリックする。

↓


Setup Run
Maintenance
Desorb
Required solutions (from Maintenance Kit):
BIAdesorb solution 1
BIAdesorb solution 2
NOTE: Do not run this procedure with analysis or rack temperature below 20°C.
Click Next to continue.

内容を確認後、**Next >**をクリックする。

↓

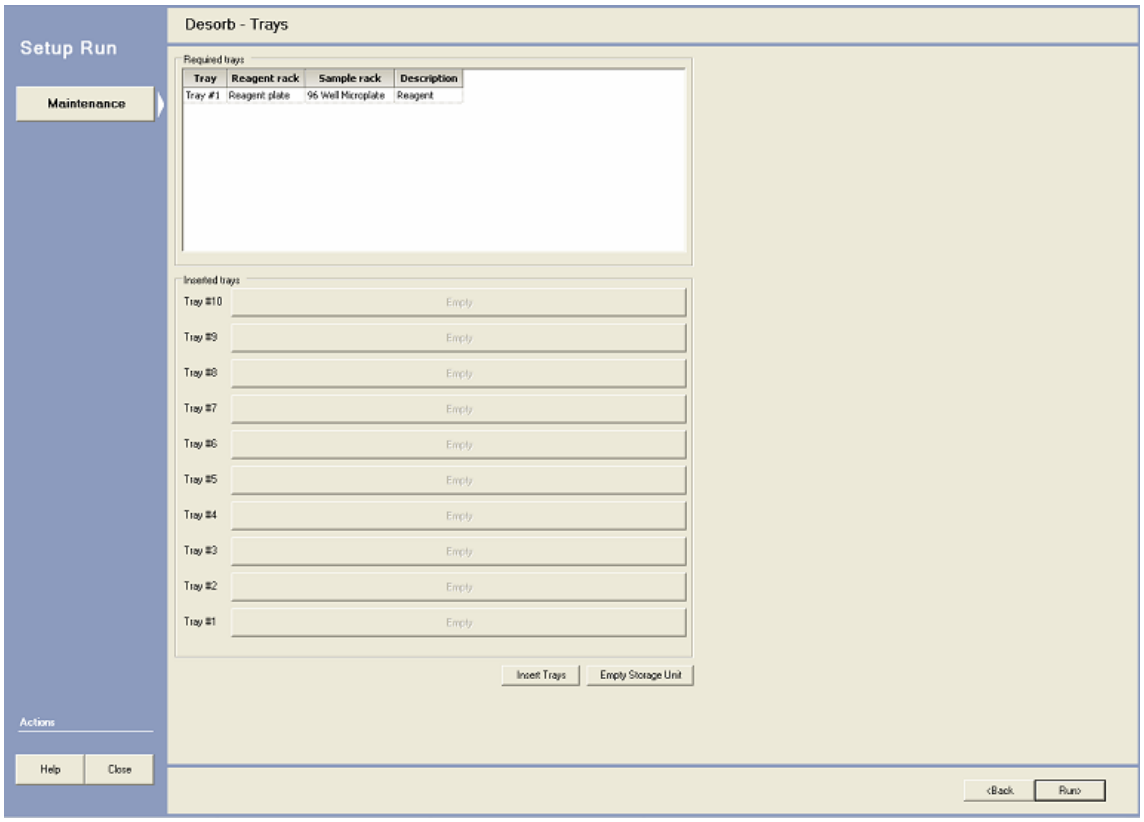


↓

試薬プレートの所定の位置に BIAdesorb solution 1 および BIAdesorb solution 2 を分注する。（要求量は 3800µl であるが、1500µl で足りる。）

Next >をクリックする。

↓



Insert Trays をクリックしラックトレイを挿入後 **Run >**をクリックする。

↓

Desorb が終了した後、装置は自動的に **Standby flow** の状態になる。

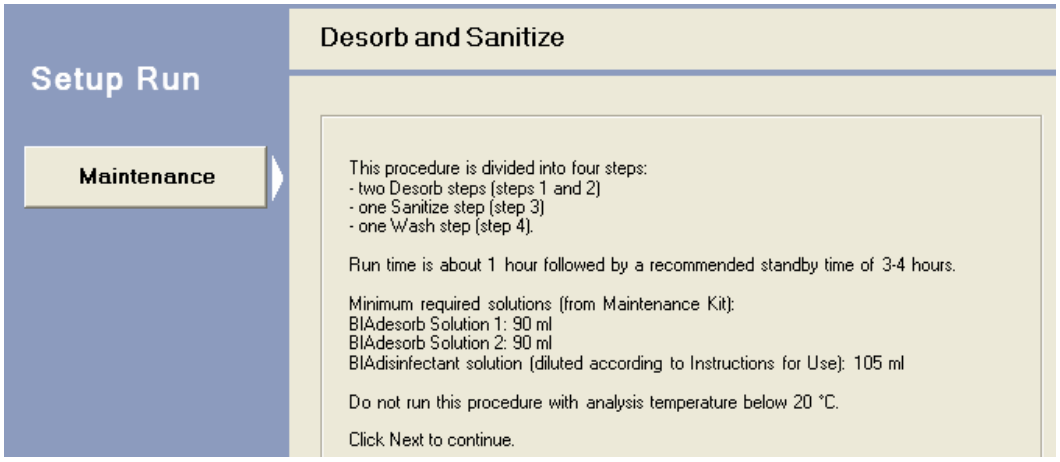
7-1-2.　Desorb and Sanitize

すべてのフローシステムの洗浄および滅菌を行う操作。
ボトルから洗浄溶液を供給し実施する。実施頻度は月 1 回が目安。
所要時間約 1 時間。

＊必要な試薬
・BIAdesorb solution 1（0.5 % SDS）
・BIAdesorb solution 2（50 mM Gly-NaOH、pH 9.5）
・BIAdisinfectant solution（原液 7.5 ml を超純水 100 ml に加えて使用する）
＊ランニング緩衝液：超純水

Desorb and Sanitize を選択してダブルクリックする。

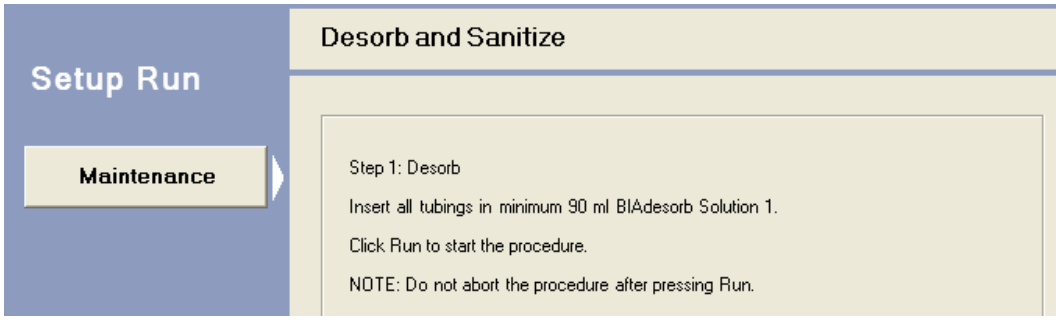
↓


Setup Run
Maintenance
Desorb and Sanitize
This procedure is divided into four steps:
- two Desorb steps (steps 1 and 2)
- one Sanitize step (step 3)
- one Wash step (step 4).
Run time is about 1 hour followed by a recommended standby time of 3-4 hours.
Minimum required solutions (from Maintenance Kit):
BIAdesorb Solution 1: 90 ml
BIAdesorb Solution 2: 90 ml
BIAdisinfectant solution (diluted according to Instructions for Use): 105 ml
Do not run this procedure with analysis temperature below 20 °C.
Click Next to continue.

Next >をクリックする。

↓

ステップ 1

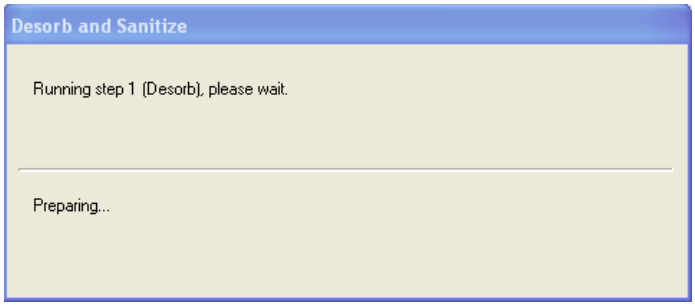

Setup Run
Maintenance
Desorb and Sanitize
Step 1: Desorb
Insert all tubings in minimum 90 ml BIAdesorb Solution 1.
Click Run to start the procedure.
NOTE: Do not abort the procedure after pressing Run.

すべてのチューブを 90 ml の BIAdesrob Solution 1 に入れる。

↓

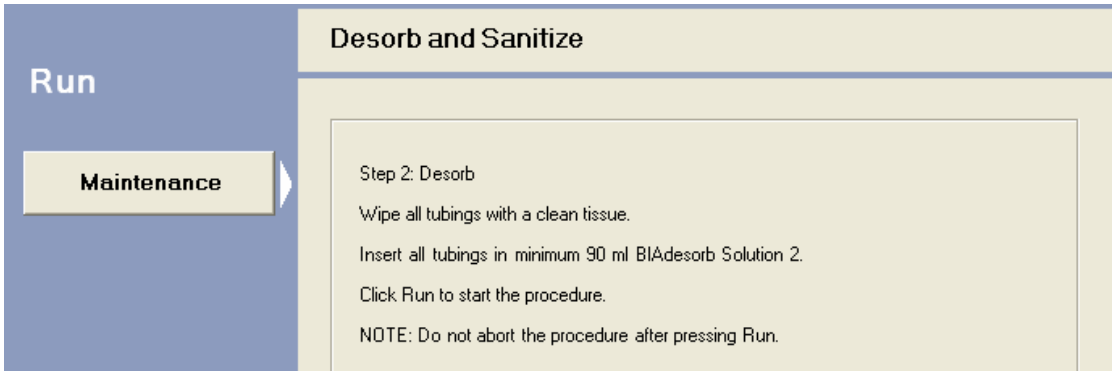
Run >をクリックする。

↓



↓

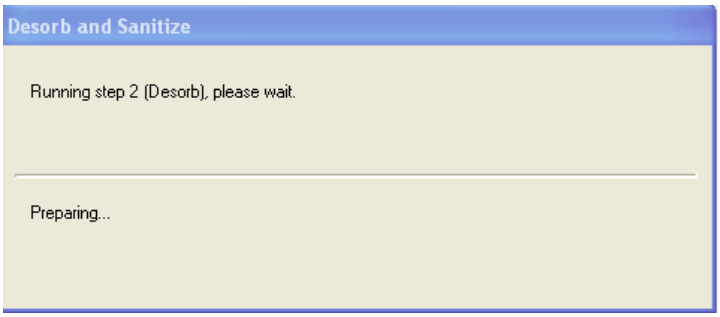
ステップ 2


Run
Maintenance
Desorb and Sanitize
Step 2: Desorb
Wipe all tubings with a clean tissue.
Insert all tubings in minimum 90 ml BIAdesorb Solution 2.
Click Run to start the procedure.
NOTE: Do not abort the procedure after pressing Run.

すべてのチューブを 90 ml の BIAdesrob Solution2 に入れる。

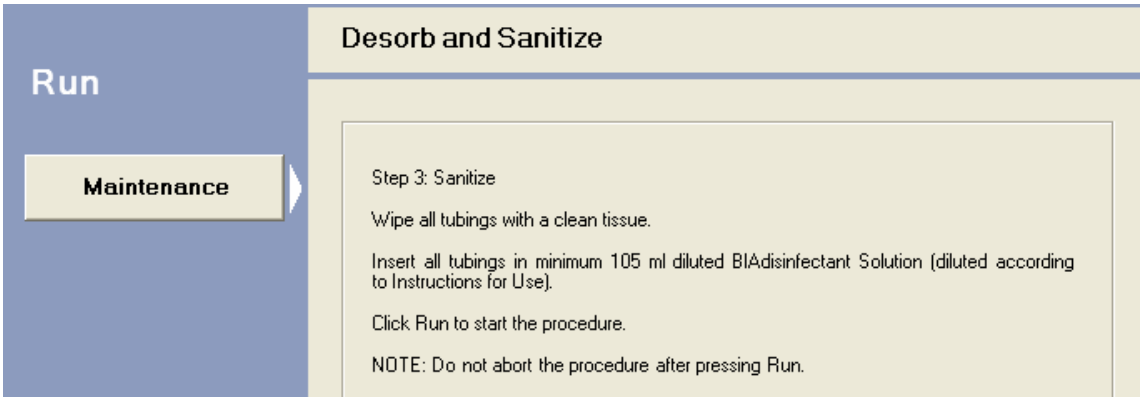
↓

Run >をクリックする。



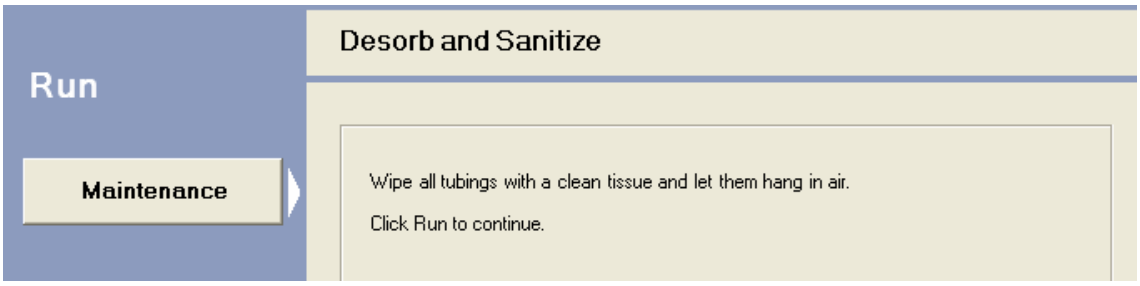
↓

ステップ 3



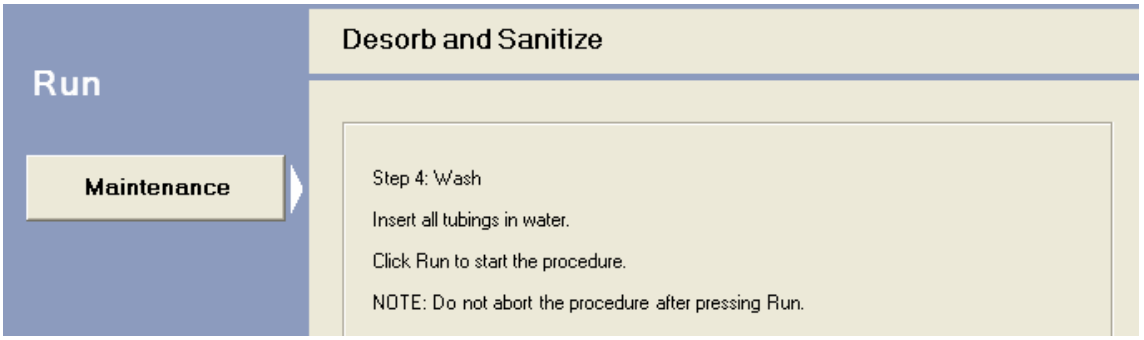
すべてのチューブを 105 ml の BIAdisinfectant solution に入れ、**Run >**をクリックする。

↓



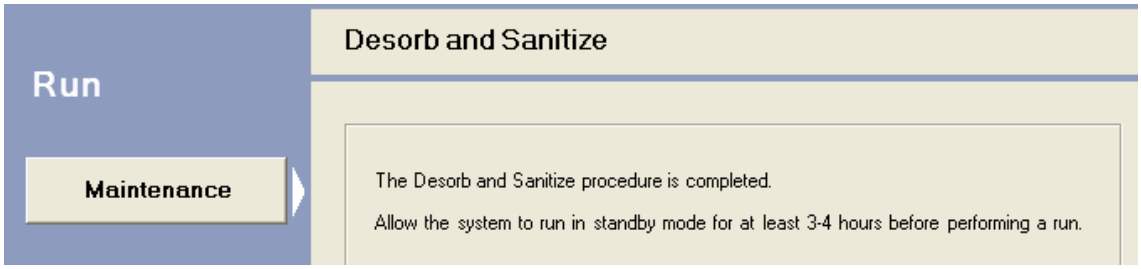
すべてのチューブをキムワイプでふき取り、空気にさらした状態で **Run >**をクリックする。

↓



すべてのチューブを超純水に入れ **Run >**をクリックする。

↓


Run
Maintenance
Desorb and Sanitize
The Desorb and Sanitize procedure is completed.
Allow the system to run in standby mode for at least 3-4 hours before performing a run.

終了後は自動的に **Standby flow** の状態になる。

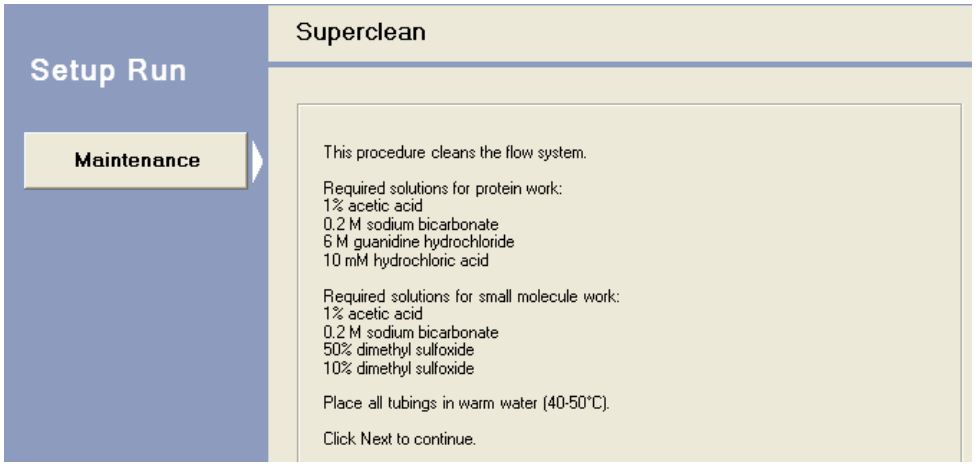
7-1-3.　Superclean

フローシステムに強固に吸着したサンプルの影響が見られる場合や、流路の詰まりが懸念される場合で Desorb、Desorb and Sanitize でも解消しない場合に行う。所要時間約 1 時間 30 分。

＊調製する試薬：
・1% acetic acid
・0.2M sodium bicarbonate
・6M guanidine hydrochloride
　（低分子化合物測定後は 50% DMSO）
・10 mM hydrochloric acid
　（低分子化合物測定後は 10% DMSO）
調製後、すべて 0.22 µm のフィルターろ過をする。

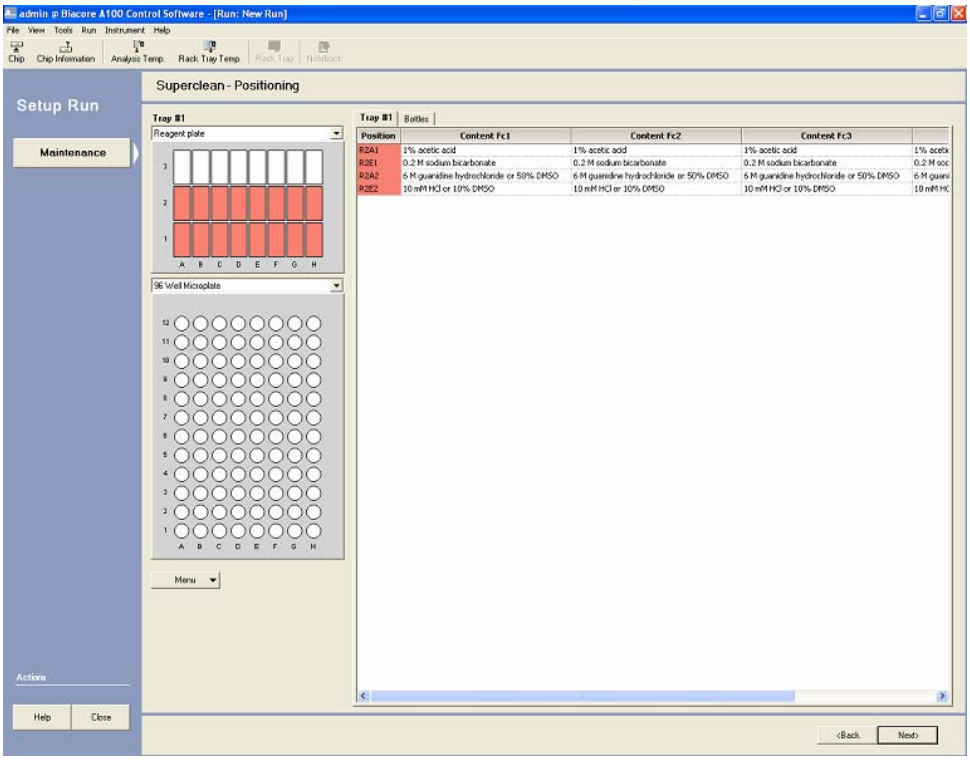
＊ランニング緩衝液：40～50℃に加温した超純水

Superclean を選択してダブルクリックする。

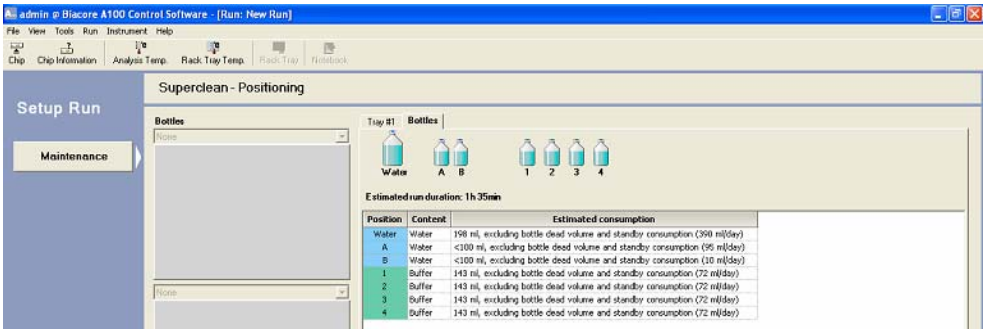


必要な試薬が表示される。確認後 **Next >**をクリックする。

↓


admin @ Biacore A100 Control Software - [Run: New Run]
File View Tools Run Instrument Help
Chip Chip Information Analysis Temp. Rack Tray Temp. Rack Tray Notebook
Setup Run
Maintenance
Superclean - Positioning
Tray #1
Reagent plate
96 Well Microplate
Menu
Tray #1 Bottles
Position Content Fc1 Content Fc2 Content Fc3
R2A1 1% acetic acid 1% acetic acid 1% acetic acid 1% acetic
R2E1 0.2 M sodium bicarbonate 0.2 M sodium bicarbonate 0.2 M sodium bicarbonate 0.2 M soc
R2A2 6 M guanidine hydrochloride or 50% DMSO 6 M guanidine hydrochloride or 50% DMSO 6 M guanidine hydrochloride or 50% DMSO 6 M guani
R2E2 10 mM HCl or 10% DMSO 10 mM HCl or 10% DMSO 10 mM HCl or 10% DMSO 10 mM HC
Actions
Help
Close
<Back
Next>

試薬プレートに必要量分注する。
Bottles タブをクリックすると超純水の必要量が確認できる。


admin @ Biacore A100 Control Software - [Run: New Run]
File View Tools Run Instrument Help
Chip Chip Information Analysis Temp. Rack Tray Temp. Rack Tray Notebook
Setup Run
Maintenance
Superclean - Positioning
Bottles
Tray #1 Bottles
Water A B 1 2 3 4
Estimated run duration: 1h 35min
Position Content Estimated consumption
Water Water 198 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (390 ml/day)
A Water <100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (95 ml/day)
B Water <100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (10 ml/day)
1 Buffer 143 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)
2 Buffer 143 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)
3 Buffer 143 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)
4 Buffer 143 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)

↓

Next >をクリックする。

↓

Insert Trays をクリックしラックトレイを挿入後 **Run >**をクリックする。

↓

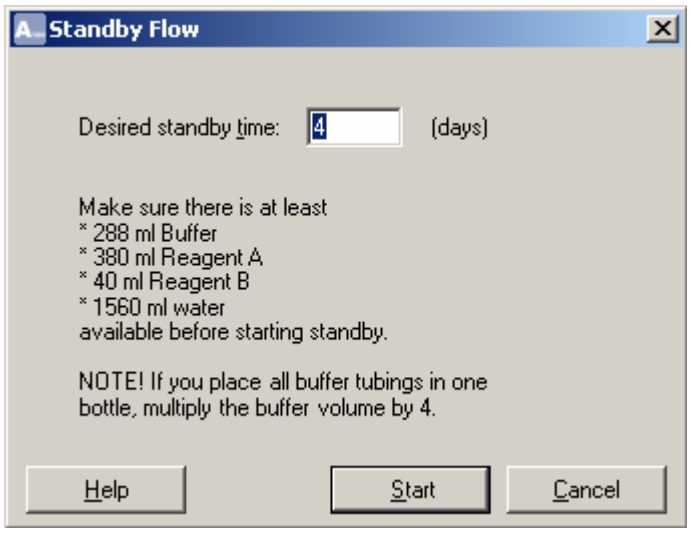
終了後は自動的に **Standby flow** 状態になる。

補足 10　メンテナンス実施例

使用終了後は速やかにメンテナンスを行うことを推奨する。
センサーチップは使い切りであるため、交換せずにそのまま実施する。

測定終了
↓
Menu bar→**Instrument**→**Stop Standby** を選択し、Standby flow 状態を止める。
↓
すべてのチューブを超純水ボトルに入れる。
↓
Change Buffers 1- 4 (146 ページの 7-2-1 参照)を実行する。
↓
Desorb を実行する。
↓
（月に 1 度は **Desorb and Sanitize** を実行する。）
↓
Standby 状態で放置

＜Standby の期間設定＞
Menu bar→Instrument→Standby...で期間を設定する。（デフォルトは 4 日間）



Desired standby time: に日数を入力する。最長 14 日間。
↓
超純水を要求量セットし **Start** をクリックする。

7-2. フローシステムの洗浄

7-2-1. Change Buffers 1- 4

ランニング緩衝液を交換する際に実行する。所要時間約 10 分間。
ランニング緩衝液の消費量：約 40 ml / 1 フローセル
装置が Standby 状態であれば **Menu bar** の **Instrument→Stop Standby** を選択し、Standby 状態を停止する。

↓

ランニング緩衝液を交換する。

↓

Change Buffers 1- 4 を実行する。

7-2-2. Change Reagent A

Reagent A の試薬を交換する際に実行する。所要時間約 5 分間。
試薬消費量：約 5 ml

7-2-3. Flow System Wash

高流速のランニング緩衝液でフローシステムを洗浄する操作。フローセル等に気泡が混入し、センサーグラムの乱れが解消しない場合に実行する。所要時間約 2 分間。
ランニング緩衝液の消費量：約 5 ml / 1 フローセル

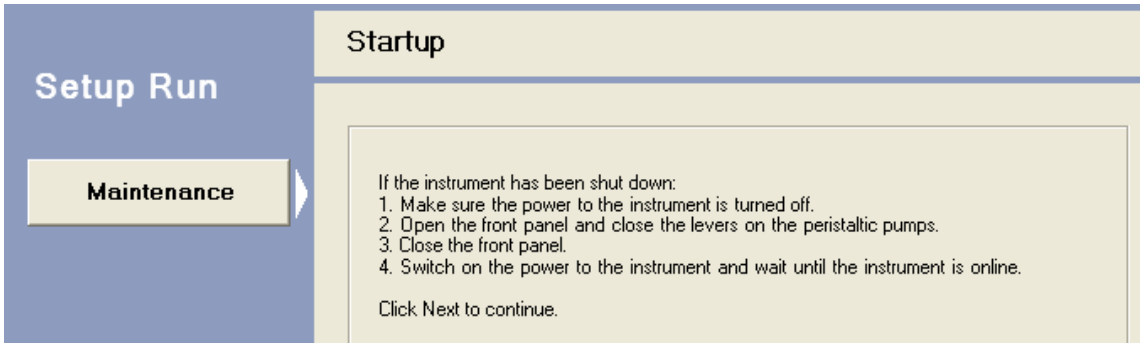
7-2-4.　Startup

装置の電源を落とした状態（159 ページの 8-2. Shutdown 実行後）から、再び立ち上げる際に実行する。
所要時間約 12 分間。

＊必要な試薬：超純水

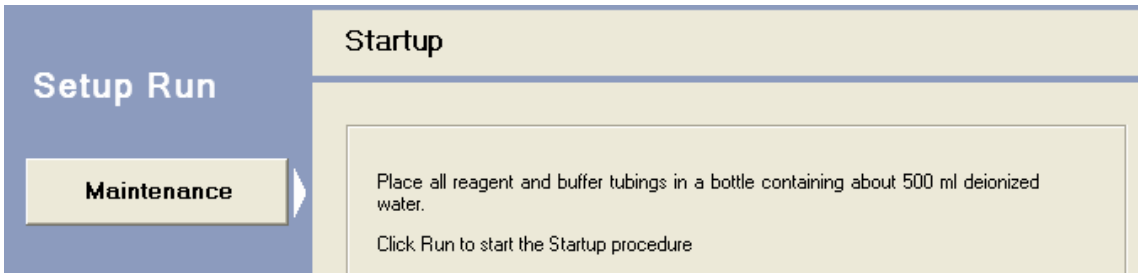
Startup を選択してダブルクリックする。

↓



Next >をクリックする。

↓



すべてのチューブを 500 ml の超純水が入ったボトルに浸し **Run >**をクリックする。

7-3. 検出器の調整

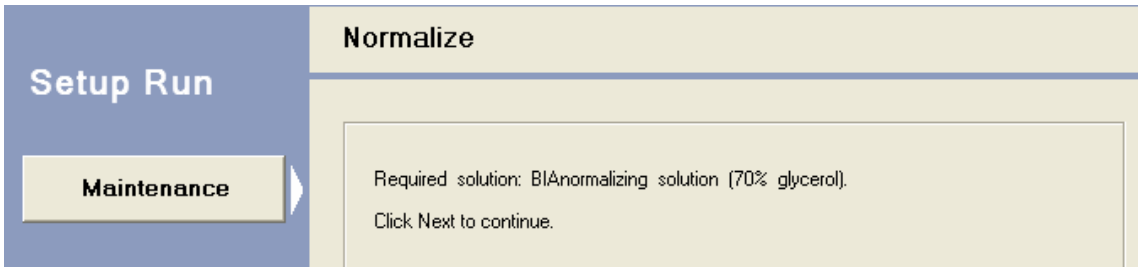
7-3-1. Normalize

検出器（フォトダイオードアレイ）の受光感度の補正を行う。
通常は新しいセンサーチップを Dock する際に実施する。
測定温度を変更した場合には別途実行する。所要時間約 10 分間。

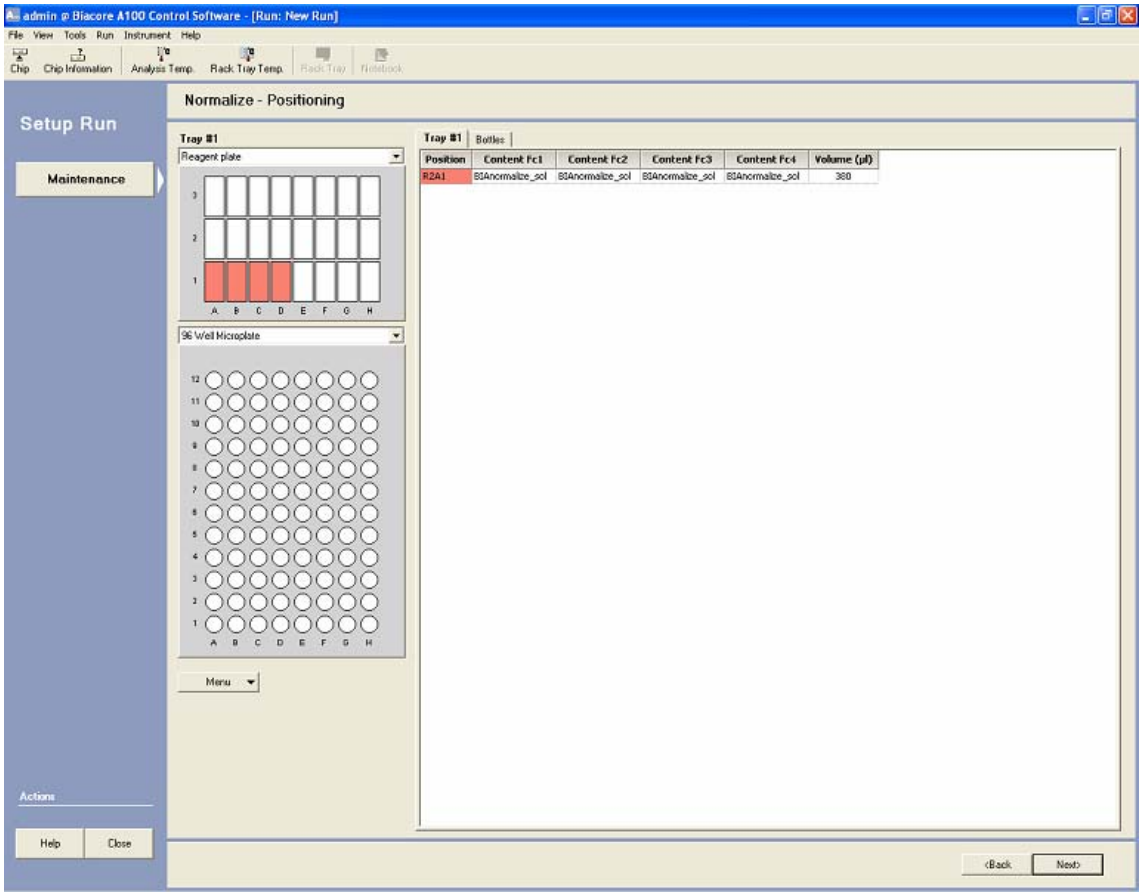
＊必要な試薬：
・BIAnormalizing solution (70% glycerol 溶液)
＊ランニング緩衝液： 測定に使用する緩衝液

Normalize を選択してダブルクリックする。

↓

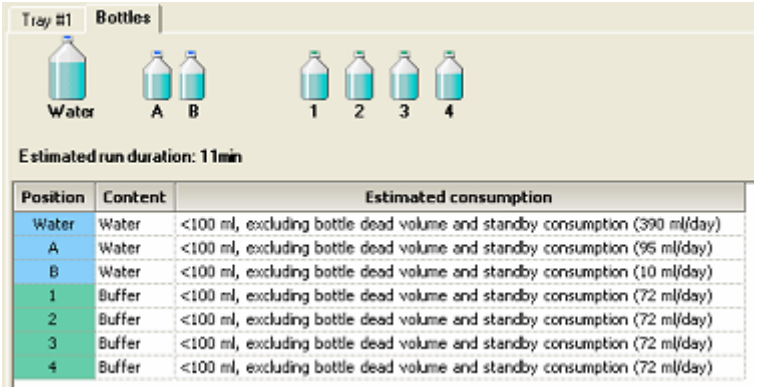


↓


admin @ Biacore A100 Control Software - [Run: New Run]
File View Tools Run Instrument Help
Chip Chip Information Analysis Temp. Rack Tray Temp. Rack Tray Notebook
Setup Run
Maintenance
Normalize - Positioning
Tray #1
Reagent plate
96 Well Microplate
Menu
Tray #1 Bottles
Position Content Fc1 Content Fc2 Content Fc3 Content Fc4 Volume (µl)
R2A1 BIAnormalize_sol BIAnormalize_sol BIAnormalize_sol BIAnormalize_sol 380
Actions
Help Close
<Back Next>

試薬プレートに 380µl の BIAnormalizing solution を分注する。

↓


Tray #1 Bottles
Water A B 1 2 3 4
Estimated run duration: 11min
Position Content Estimated consumption
Water Water <100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (390 ml/day)
A Water <100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (95 ml/day)
B Water <100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (10 ml/day)
1 Buffer <100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)
2 Buffer <100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)
3 Buffer <100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)
4 Buffer <100 ml, excluding bottle dead volume and standby consumption (72 ml/day)

Bottles タブをクリックすると実行時間、緩衝液の必要量が表示される。

Next >をクリックする。

↓

Insert Trays をクリックしラックトレイを挿入後 **Run >**をクリックする。

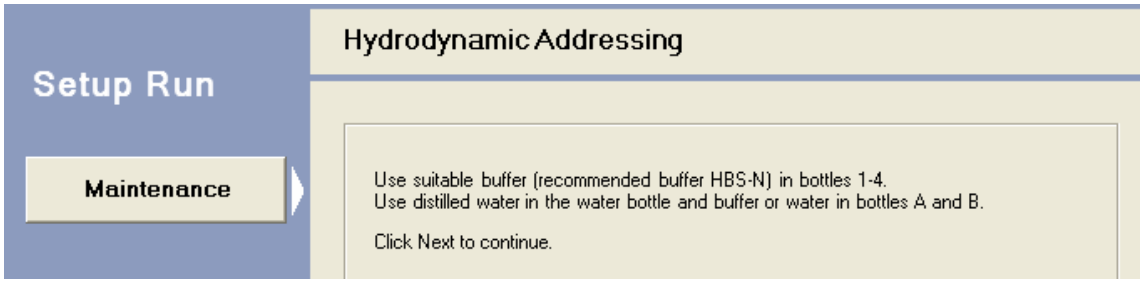
7-3-2. Hydrodynamic Addressing

各フローセルのスポット間の流れを調整する操作。通常は新しいセンサーチップを Dock する際に実施する。Normalize とあわせ実行することを推奨する。
所要時間約 20 分間。
（注意）固定化済みのセンサーチップで実施しないこと。

＊必要な試薬：BIAnormalizing solution
＊ランニング緩衝液：150 mM NaCl を含む緩衝液（純正の HBS 緩衝液推奨）

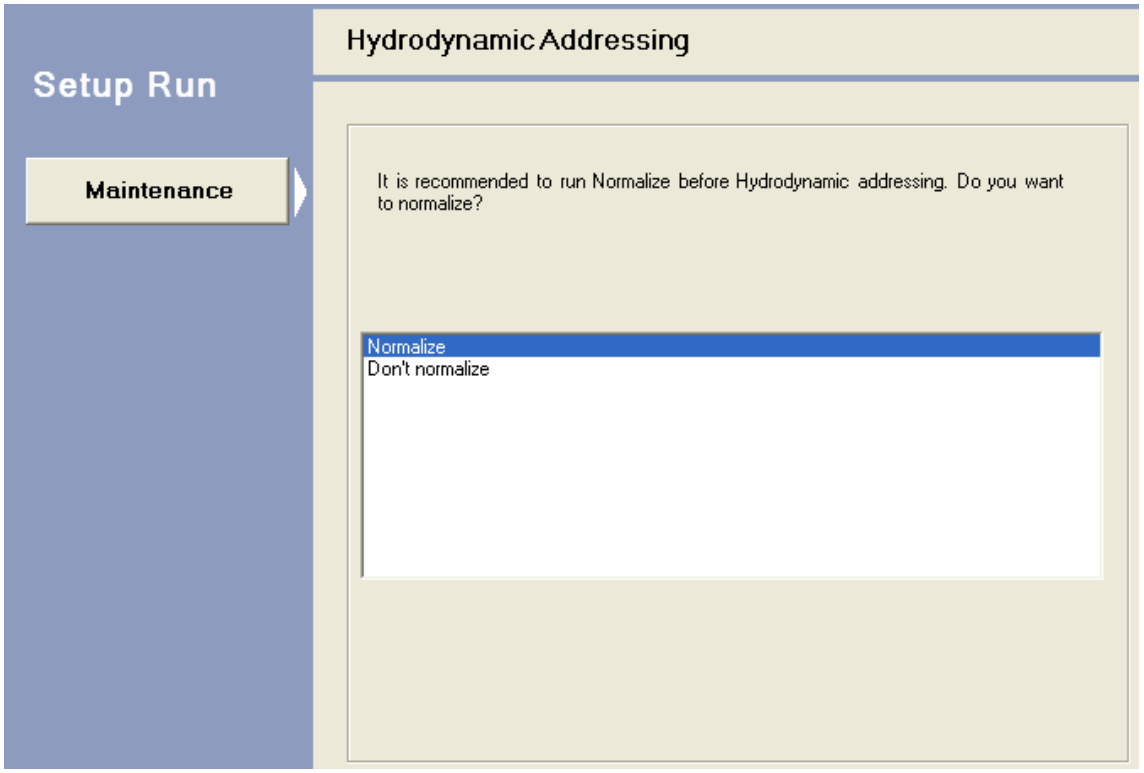
Hydrodynamic Addressing を選択してダブルクリックする。

↓


Setup Run
Maintenance
Hydrodynamic Addressing
Use suitable buffer (recommended buffer HBS-N) in bottles 1-4.
Use distilled water in the water bottle and buffer or water in bottles A and B.
Click Next to continue.

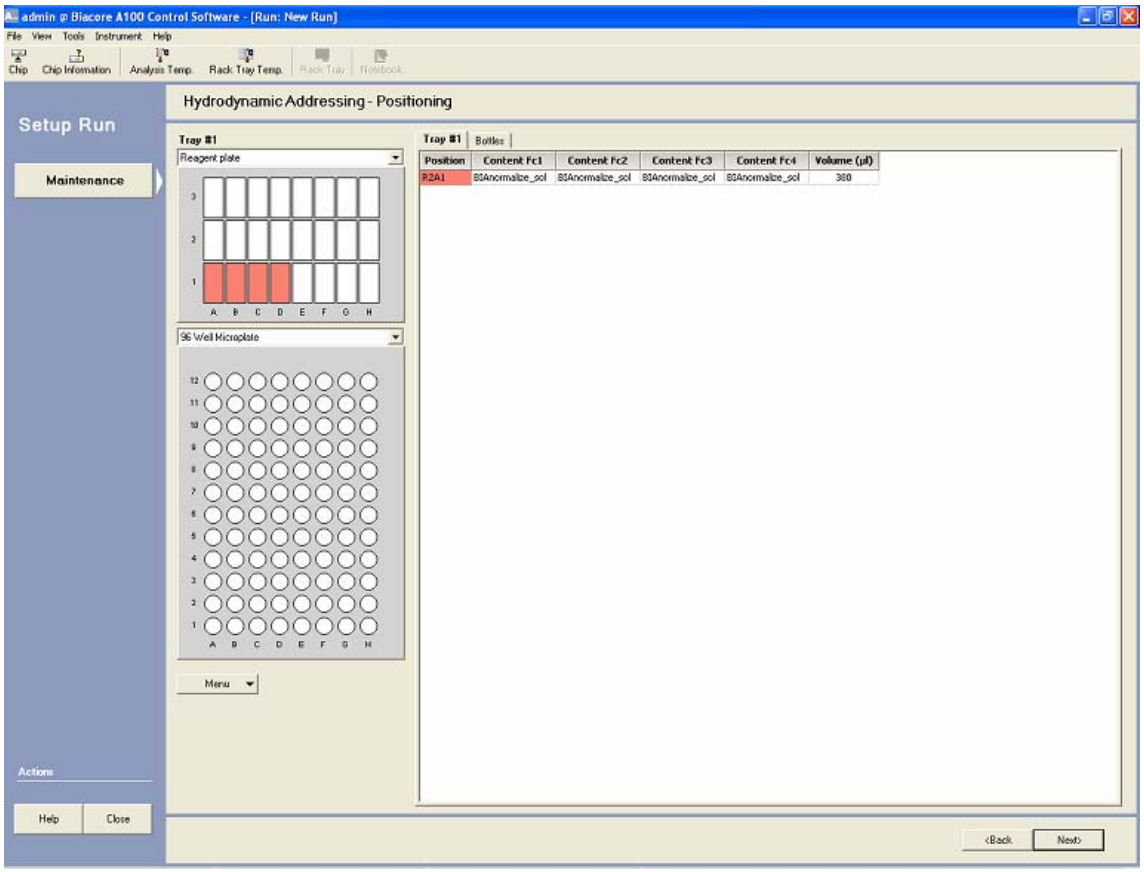
Next >をクリックする。

↓



Normalize を選択し **Next >**をクリックする。

↓

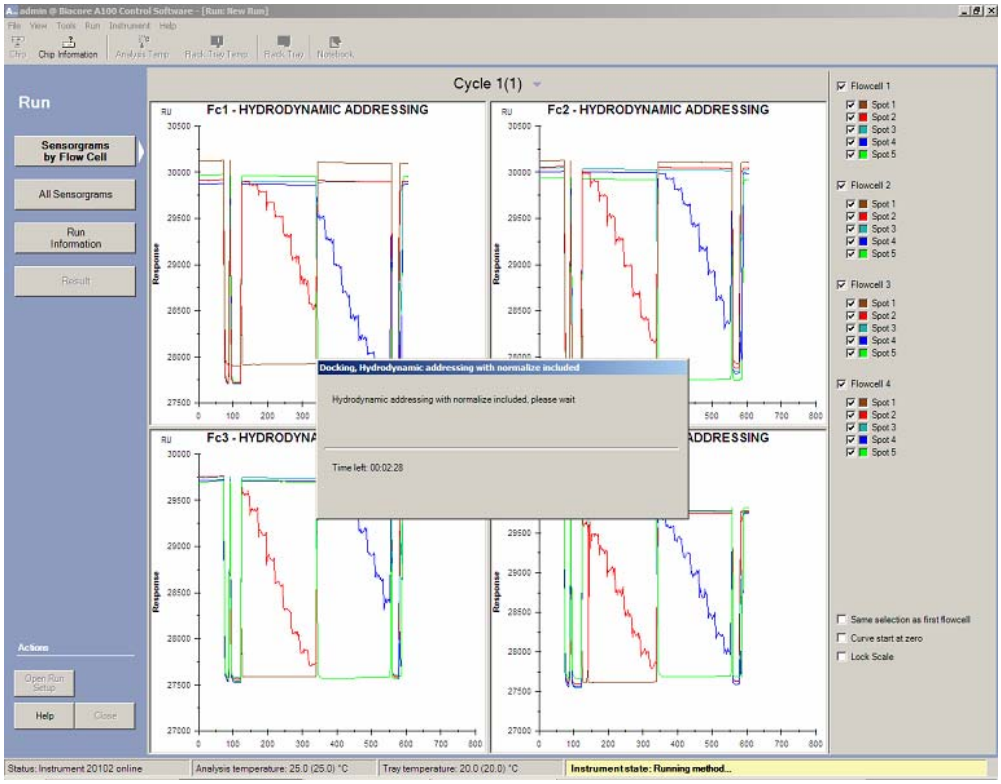


BIAnormalizing solution を用意し **Next >**をクリックする。

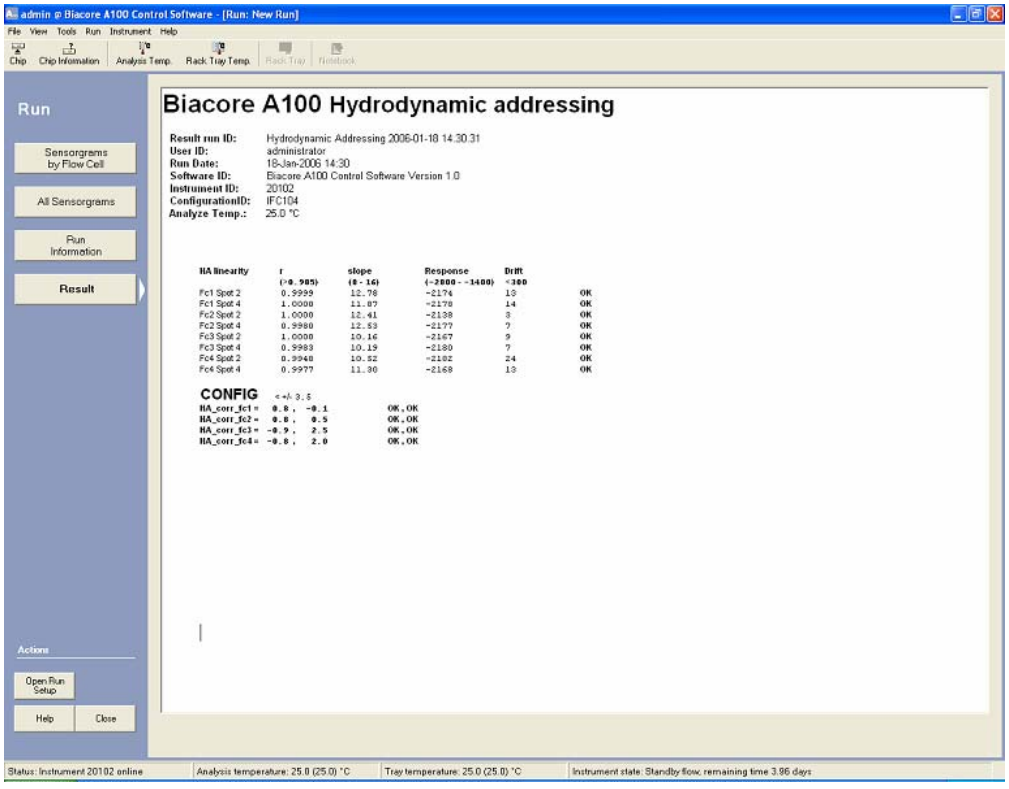
↓

Insert Trays をクリックしラックトレイを挿入後 **Run >**をクリックする。

↓



↓



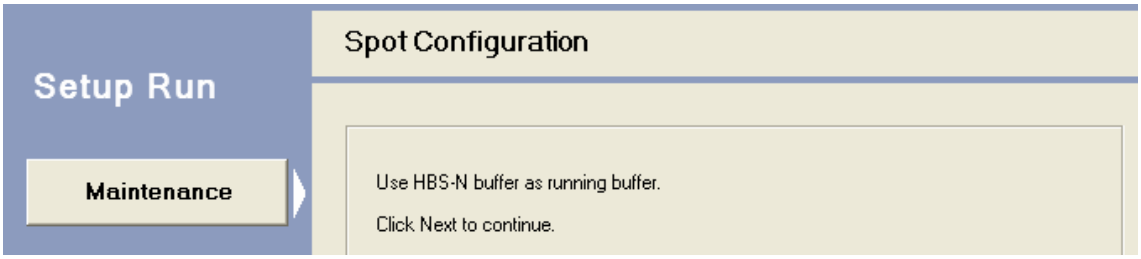
基準値内であれば **OK**、外れた場合には **Bad** が表示される。

7-3-3.　Spot Configuration

Hydrodynamic Addressing で Bad が頻発する場合に実施する。
検出器（フォトダイオードアレイ）の受光領域の微調整を行う操作。
ランニング緩衝液には 150 mM NaCl 含有緩衝液を用いる。（純正の HBS 緩衝液推奨）測定温度 25℃にて実行する。所要時間約 8 分間。

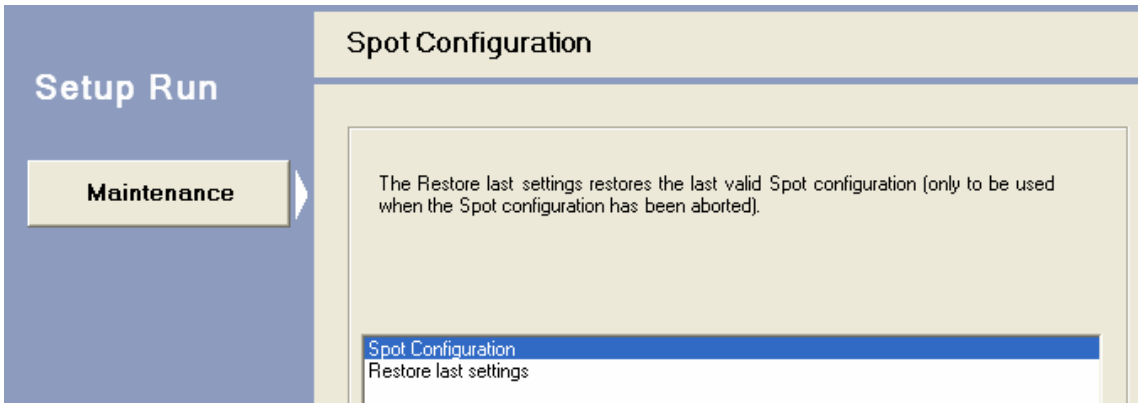
Spot Configuration を選択してダブルクリックする。

↓



Next >をクリックする。

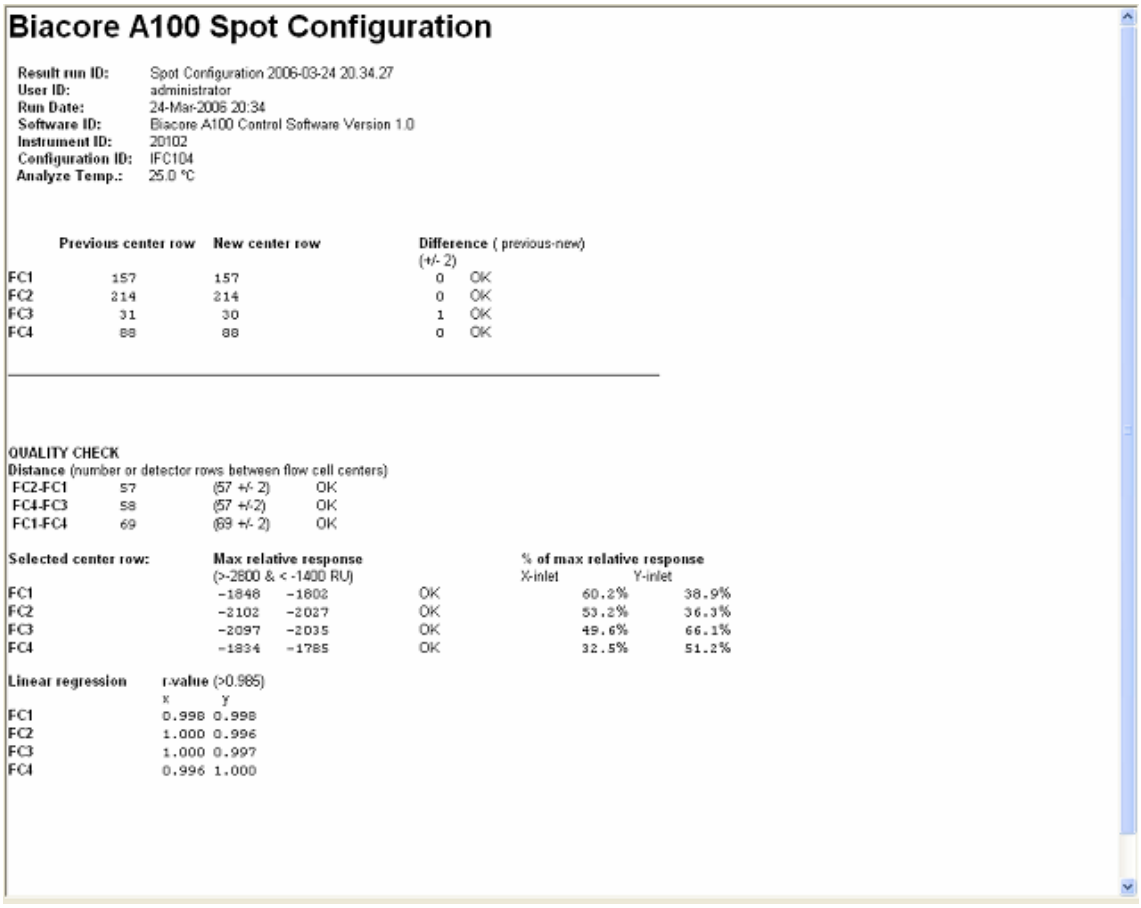
↓


Setup Run
Maintenance
Spot Configuration
The Restore last settings restores the last valid Spot configuration (only to be used when the Spot configuration has been aborted).
Spot Configuration
Restore last settings

Spot Configuration を選択して **Next >**をクリックする。

↓

実行結果



Biacore A100 Spot Configuration

Result run ID: Spot Configuration 2006-03-24 20.34.27
User ID: administrator
Run Date: 24-Mar-2006 20:34
Software ID: Biacore A100 Control Software Version 1.0
Instrument ID: 20102
Configuration ID: IFC104
Analyze Temp.: 25.0 °C

	Previous center row	New center row	Difference (previous-new) (+/- 2)	
FC1	157	157	0	OK
FC2	214	214	0	OK
FC3	31	30	1	OK
FC4	88	88	0	OK

QUALITY CHECK
Distance (number or detector rows between flow cell centers)

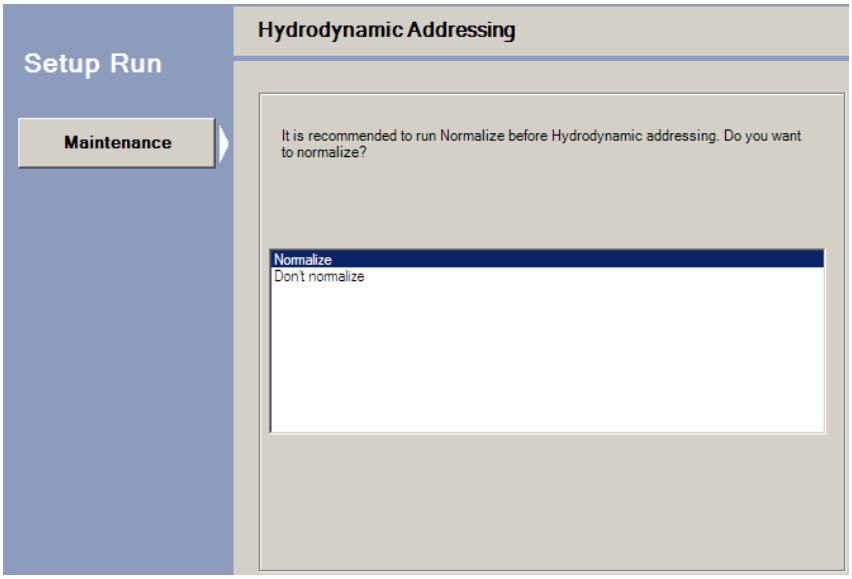
FC2-FC1	57	(57 +/- 2)	OK
FC4-FC3	58	(57 +/-2)	OK
FC1-FC4	69	(69 +/- 2)	OK

Selected center row:	Max relative response (>-2800 & < -1400 RU)			% of max relative response X-inlet	Y-inlet
FC1	-1848	-1802	OK	60.2%	38.9%
FC2	-2102	-2027	OK	53.2%	36.3%
FC3	-2097	-2035	OK	49.6%	66.1%
FC4	-1834	-1785	OK	32.5%	51.2%

Linear regression	r-value (>0.985) x	y
FC1	0.998	0.998
FC2	1.000	0.996
FC3	1.000	0.997
FC4	0.996	1.000

↓

すべて OK であれば再度 Hydrodynamic Addressing を実行する。
その際は必ず Normalize もあわせ実施する。



7-4.　システムチェック

装置の診断を行うプログラムである。必ず Desorb and Sanitize 実施後、新品のセンサーチップを挿入し実行する。シグナルのドリフトや、エアースパイクの混入が激しい場合等に実施する。（所要時間約 1 時間）使用頻度が高い場合には定期的に実行することを推奨する。

＊必要な試薬：

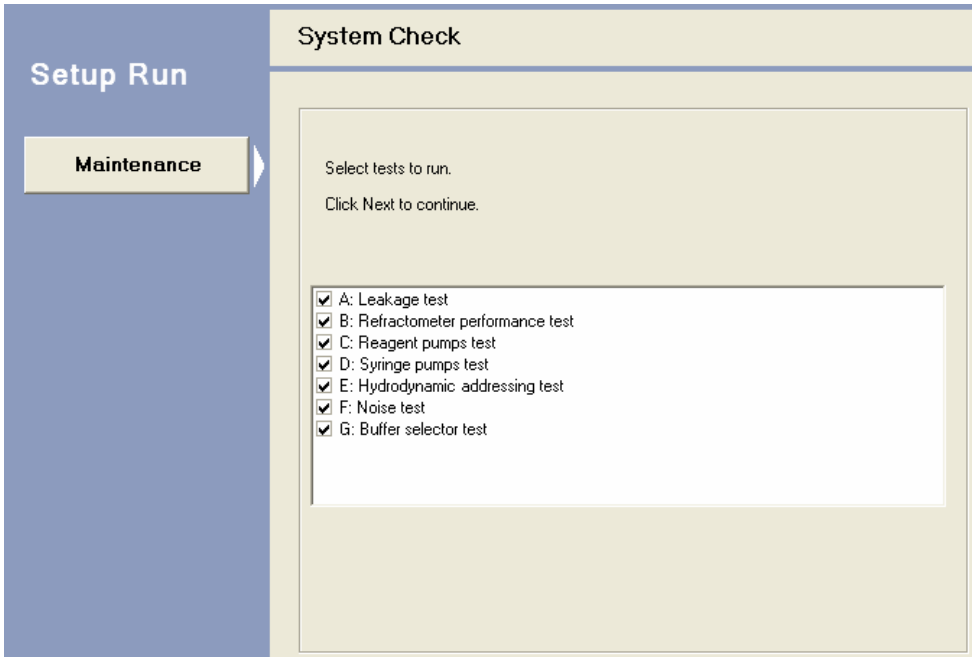
・BIAtest solution

・超純水で 2 倍希釈した HBS-N

＊ランニング緩衝液：　HBS-N

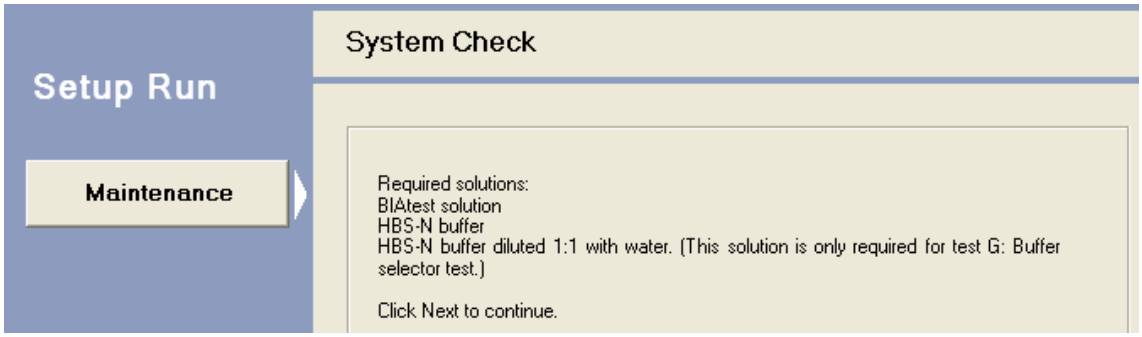
＊センサーチップ：新品の Series S Sensor chip CM5

System Check を選択してダブルクリックする。



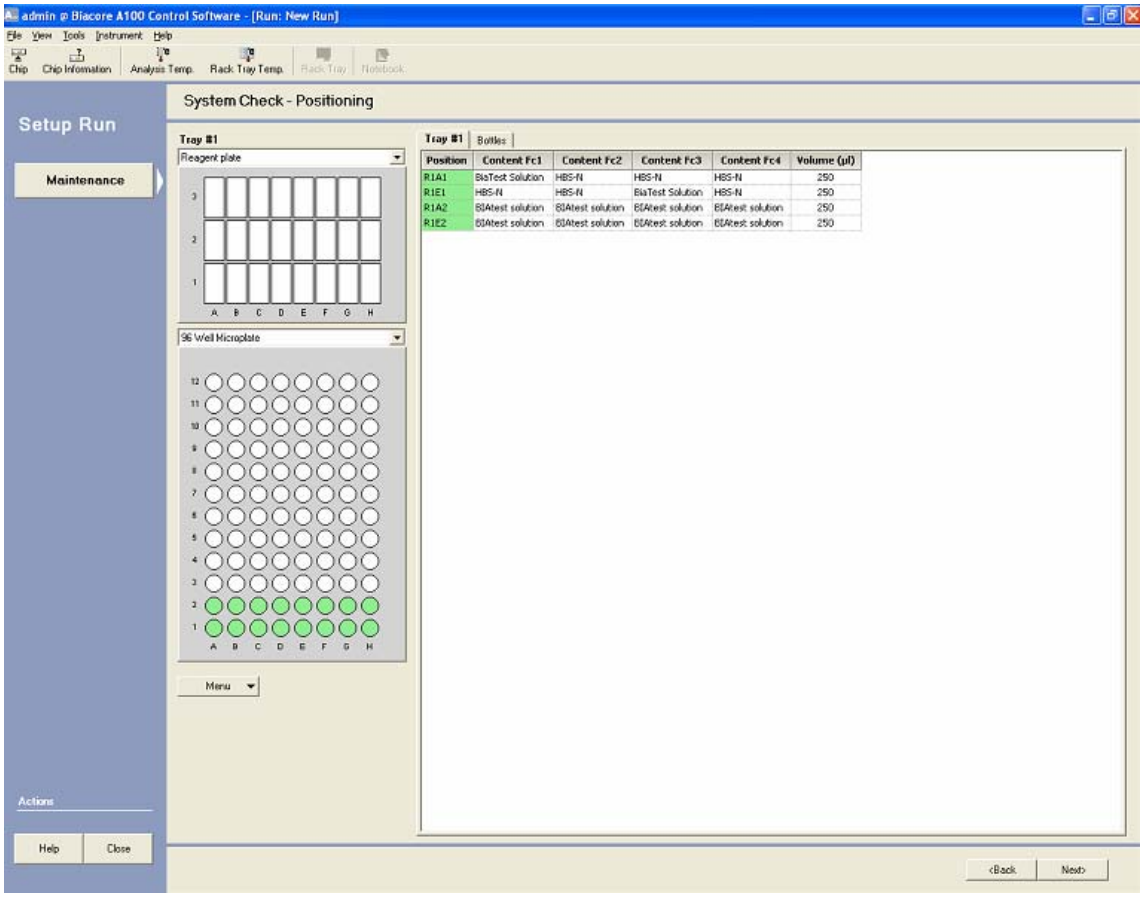
すべてにチェックを入れ **Next >**をクリックする。

↓



必要な溶液が表示される。確認後 **Next >**をクリックする。

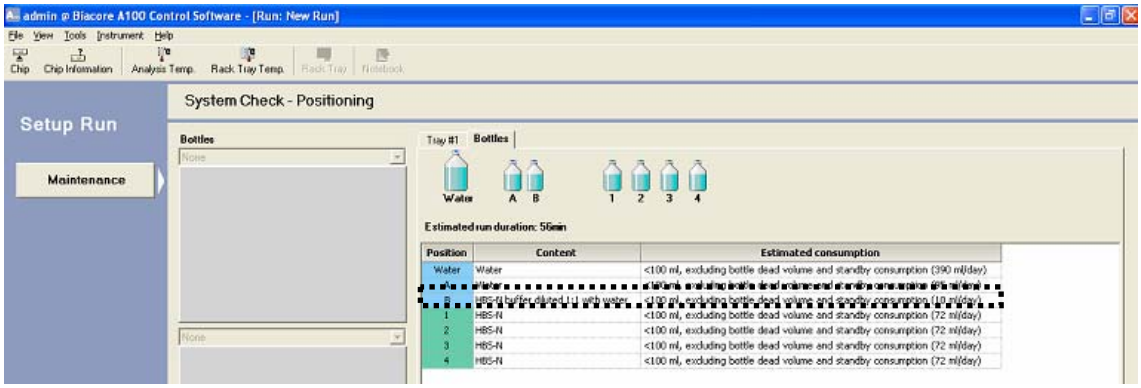
↓



96 ウェルプレートに必要な試薬を分注する。

↓

Bottles タブをクリックする。



＊ポジション B は超純水で 2 倍希釈した HBS-N。

↓

Next >をクリックする。

↓

Insert Trays をクリックしラックトレイを挿入後 **Run >**をクリックする。

↓

終了後にチェック結果が表示される。

Biacore A100 System Check

Result run ID:	System Check 2006-01-11 15.13.37
User ID:	administrator
Run Date:	11-Jan-2006 15:13
Software ID:	Biacore A100 Control Software Version 1.0
Instrument ID:	20102
Configuration ID:	IFC104
Analyze Temp.:	25.0 °C

A. Flow cell leakage test:	**OK**
B. Refractometer test:	**OK**
C. Reagent pump test:	**OK**
D. Syringe pumps test:	**OK**
E. Hydrodynamic addressing test:	**OK**

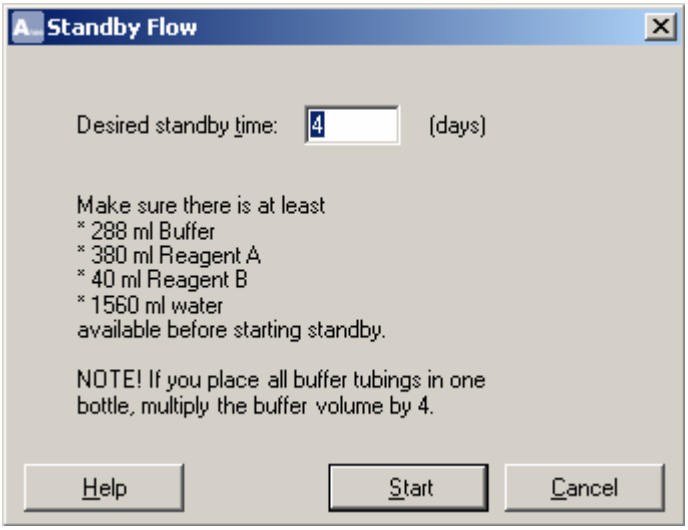
各チェック項目について測定値が正常値範囲内であれば“**OK**”、範囲外であれば“**BAD**”と診断される。**BAD** が表示されている項目がある場合には弊社技術サービス部に連絡する。

8.　測定の終了

測定が終了した場合には、Standby flow 状態で装置を維持する。
長期間使用予定のない場合には、Shutdown を実行して電源を落とす。
Shutdown の操作は装置管理者が行うことを推奨する。

8-1.　Standby Flow 状態での放置

測定が終了すると自動的に **Standby flow** 状態（デフォルトは 4 日間）
になるが、**Menu bar→Instrument→Standby...**で期間を設定することも可能。



Desired standby time: に日数を入力する。最長 14 日間。

↓

各溶液の必要量が表示される。

（注意）
・ランニング緩衝液の 4 本のチューブを 1 つのボトルにセットする場合は
　上図表示の Buffer 量を 4 倍した容量を準備する。
・廃液ボトルの空き容量にも注意する。

Status bar ；

Standby Flow 状態で放置可能な日数が表示される。

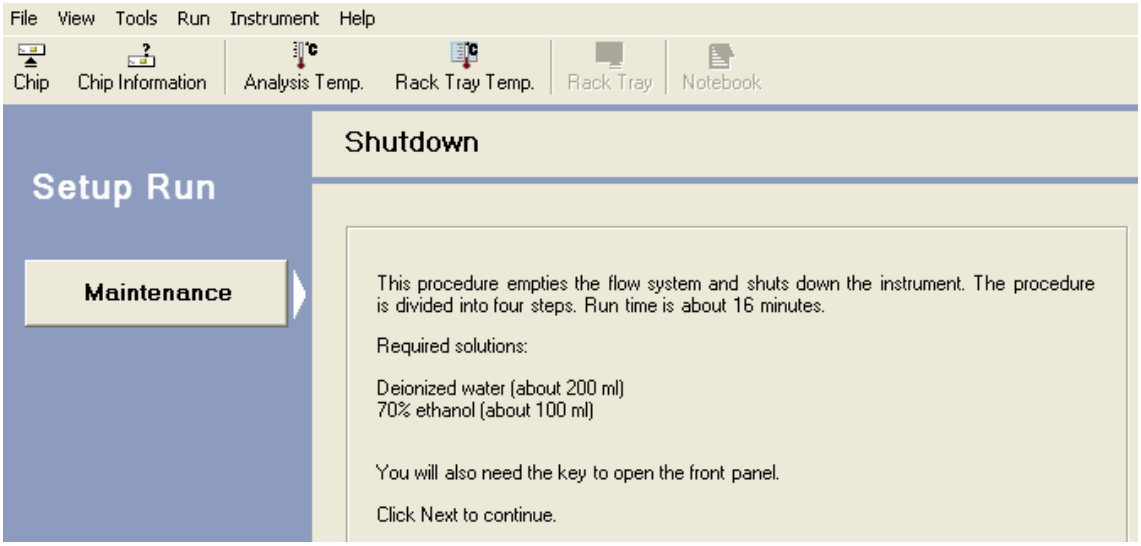
8-2.　Shutdown の実行

1 ヶ月以上使用予定のない場合に実行する。**Desorb and Sanitize** 実施後に行う。
所要時間約 16 分間。

＊調製する試薬：　70%エタノール
＊ランニング緩衝液：　超純水

Shutdown を選択してダブルクリックする。

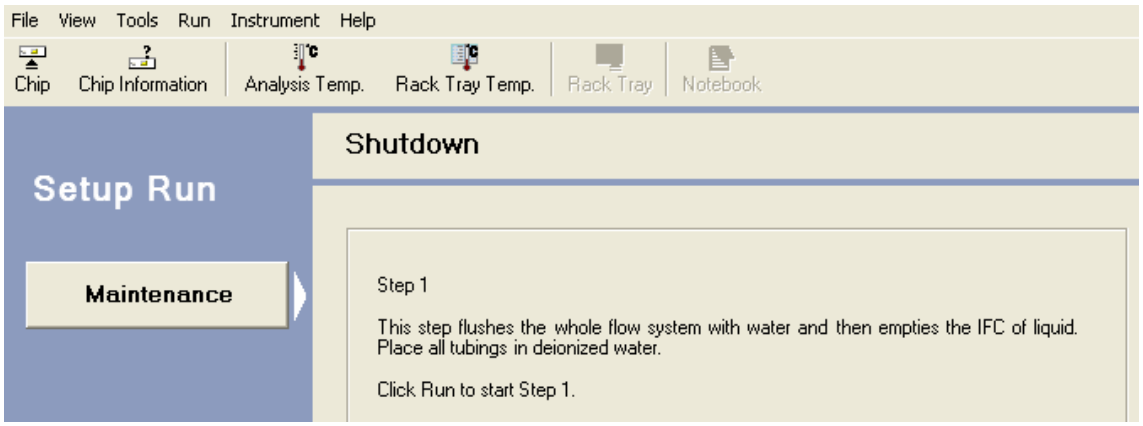
↓


File View Tools Run Instrument Help
Chip
Chip Information
Analysis Temp.
Rack Tray Temp.
Rack Tray
Notebook
Setup Run
Maintenance
Shutdown
This procedure empties the flow system and shuts down the instrument. The procedure is divided into four steps. Run time is about 16 minutes.
Required solutions:
Deionized water (about 200 ml)
70% ethanol (about 100 ml)
You will also need the key to open the front panel.
Click Next to continue.

Next >をクリックする。

↓

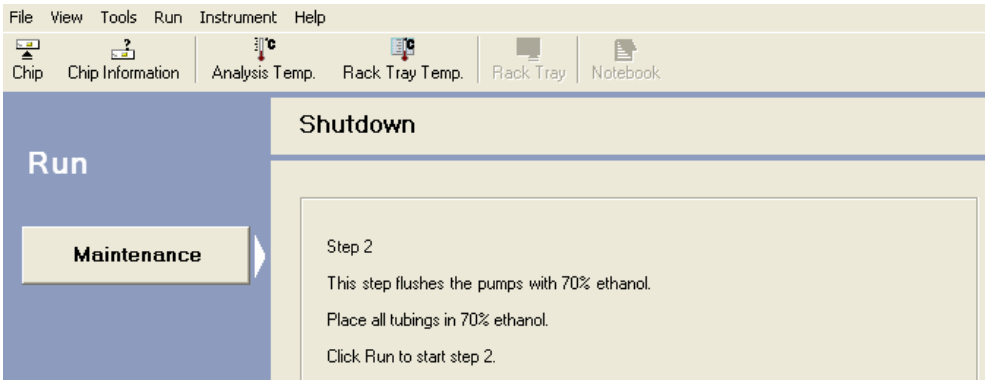
ステップ 1



すべてのチューブを超純水に浸し **Run >**をクリックする。

↓

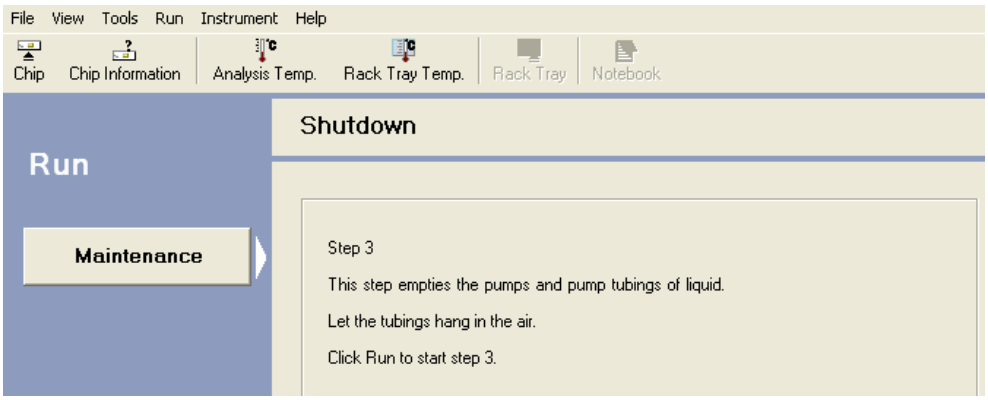
ステップ 2



すべてのチューブを 70%エタノール溶液に浸し **Run >**をクリックする。

↓

ステップ 3



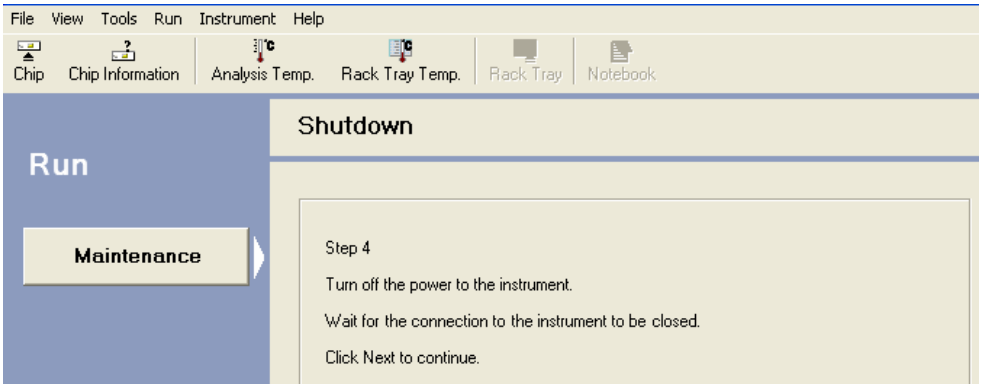
すべてのチューブをエタノール溶液から取り出し **Run >**をクリックする。

↓

センサーチップポートが自動的に開くのでセンサーチップを取り出しポートを手で閉める。

↓

ステップ 4



装置の電源を落として **Next >**をクリックする。

↓

↓

コンピューター、外部サーモスタットユニット、モニター、プリンターの順で電源を落とす。

9. データ解析

測定結果の評価は解析専用ソフトウェア"**Biacore A100 Evaluation**"を用いて行う。

■ ステップ 1　**データの抽出**

Biacore A100 Control Software で取得したファイル（Type:Run）と、解析に使用する解析テンプレートを選択する。フローセル、スポットのデータを抽出し、さらにセンサーグラムの形状を確認し、エアーの混入等で乱れのあるデータを除外する。

↓

抽出したデータの保存（Type:Approved Data）

↓

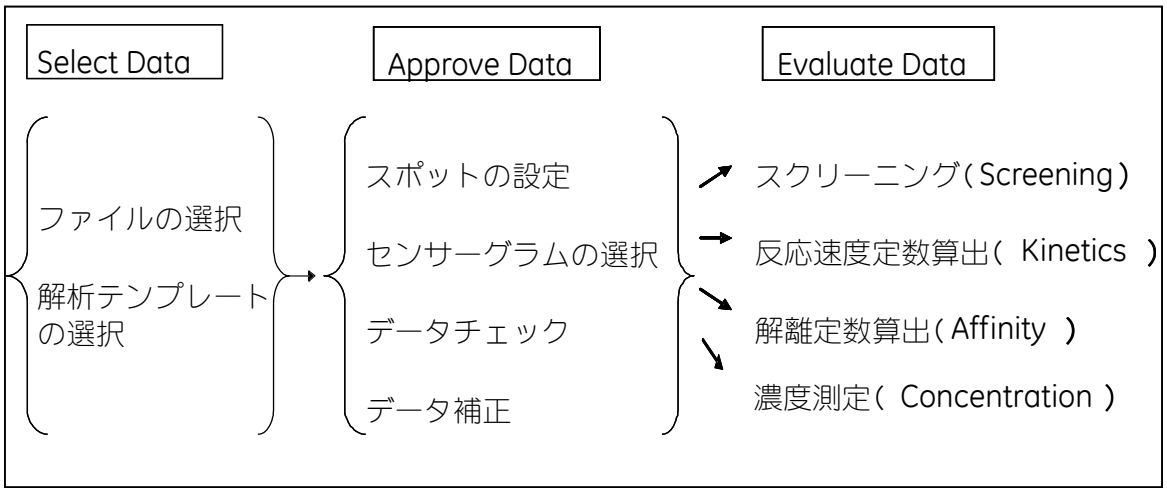
■ ステップ 2　**データ解析**

抽出したデータを用いて結合レスポンスの評価や各種定数を算出する。

↓

解析結果の保存（Type:Evaluation）

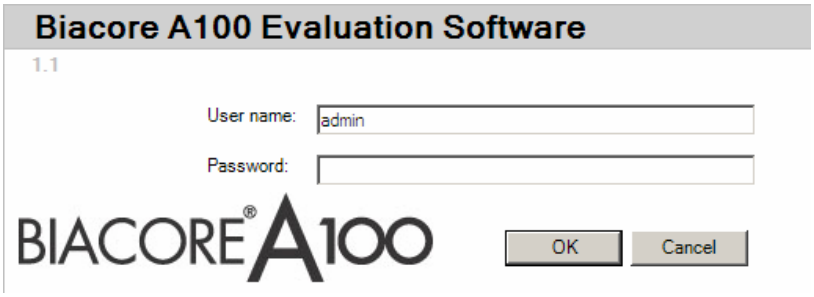
Navigation panel 名



9-1.　データの抽出

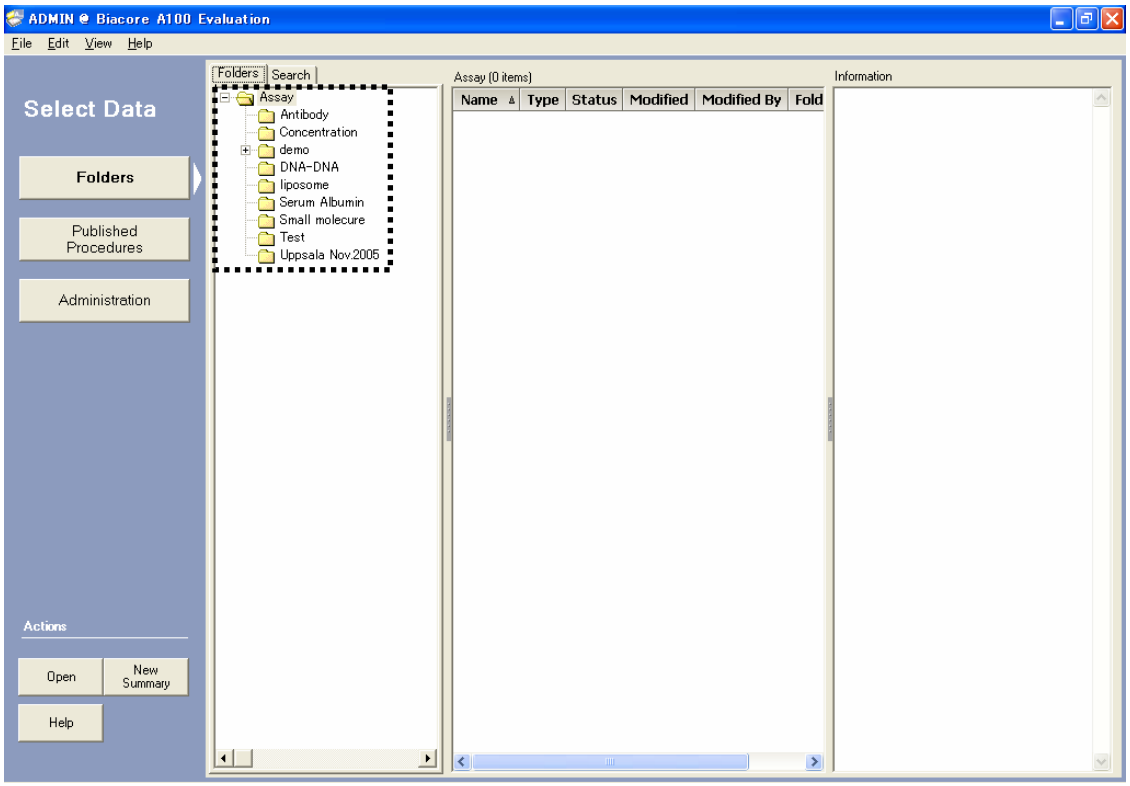
BIAcore A100 Evaluation Softoware の起動

Startメニュー　→　**BIA programs** →　**Biacore A100 Evaluation**　をクリックしソフトウェアを起動する。



User name:と **Password:**を入力し **OK** をクリックする。

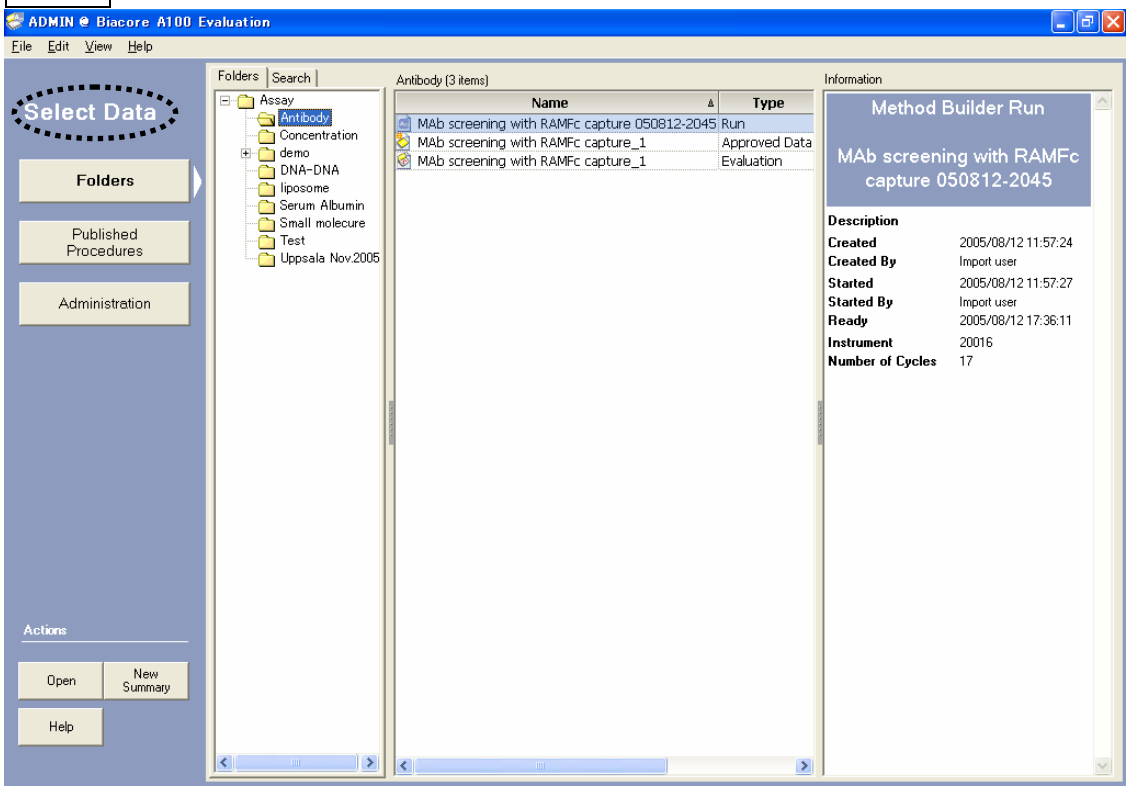
↓



Folders に格納されているファイルは Biacore A100 Control Software で表示されるものと同じである。目的のフォルダを選択する。

↓

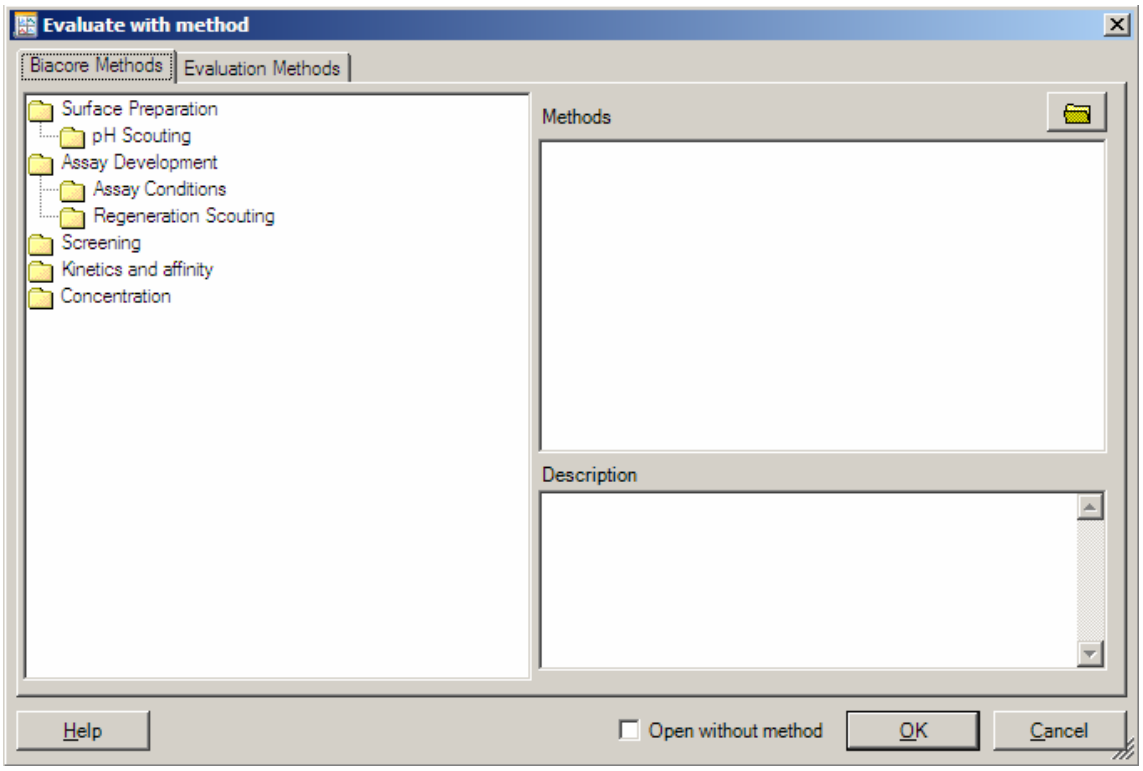
Folders



目的のファイルを選択し、ナビゲーションパネル下の **Open** をクリックする。

↓

解析テンプレートを選択する。



＜Biacore Methods＞

Surface Preparation　：固定化条件評価用テンプレート
　pH Scouting

Assay Development　：測定条件検討評価用テンプレート
　Assay Conditions
　Regeneration Scouting

Screening　：スクリーニング結果解析用テンプレート
　Screening
　Screening with capture

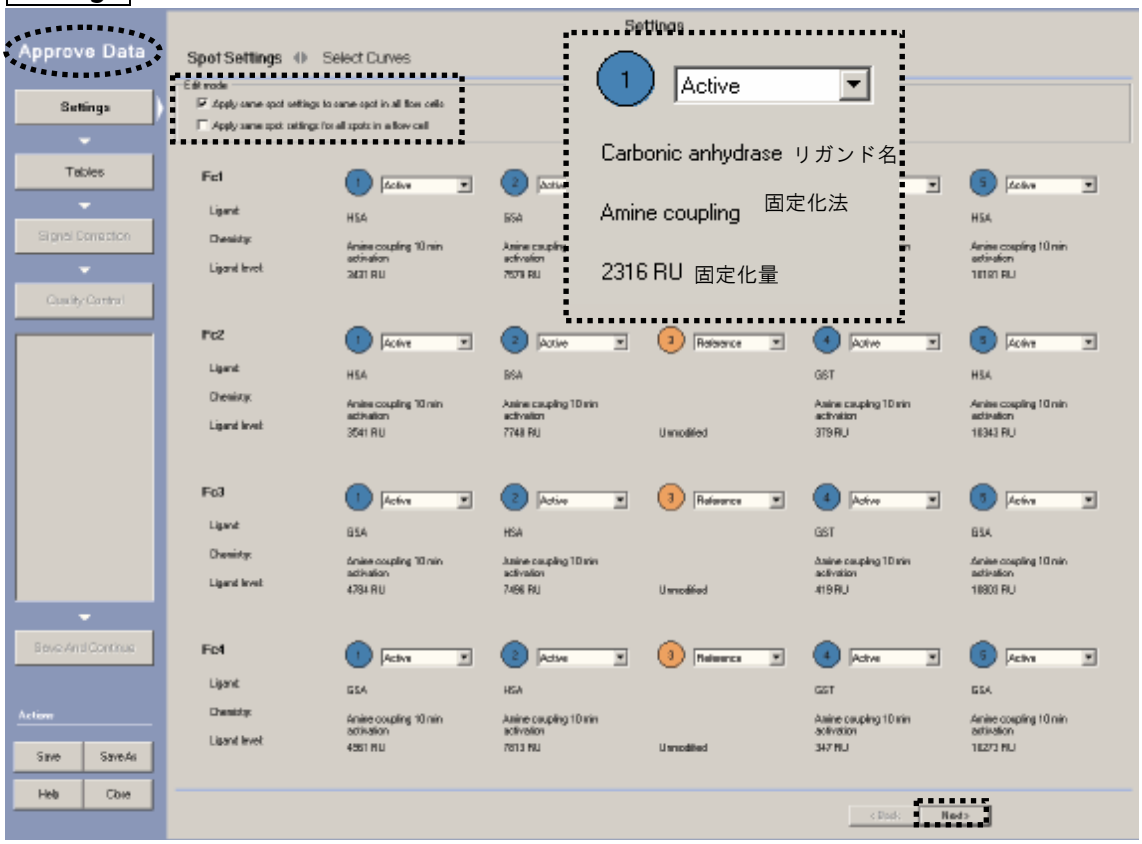
Kinetics and affinity　：反応速度定数・解離定数算出用テンプレート
　Kinetics and affinity
　Kinetics and affinity with capture

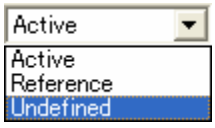
Concentration　：濃度測定用テンプレート
　Concentration

解析テンプレートを選択し **OK** をクリックする。

↓

Settings 各スポットの役割を設定する。





Active　　：リガンド固定化スポット
Reference　：リファレンススポット
Undefined　：未使用スポット

画面上部の Edit mode を用いるとスポットの役割を一括設定できる。

Apply same spot settings to same spot in all flow cells
　全フローセルの同スポットの設定が同じになる。

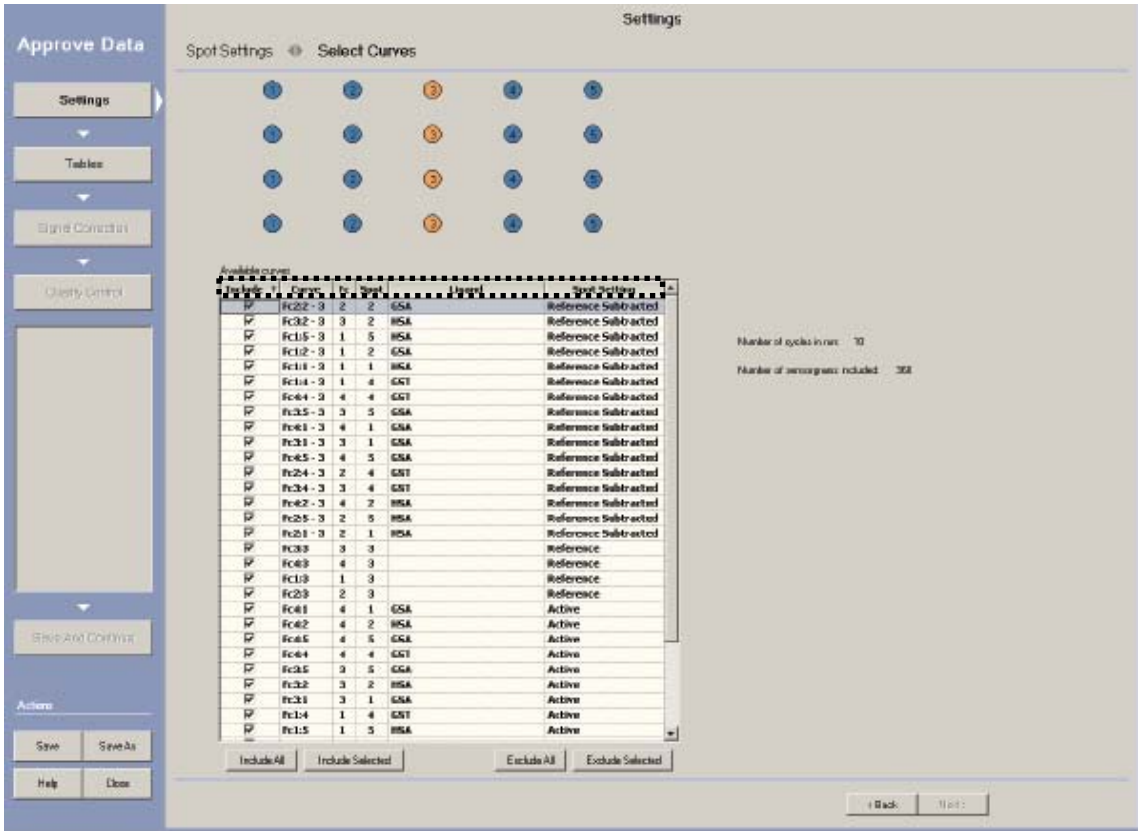
Apply same spot settings for all spots in a flow cell
　各フローセルの全スポットの設定が同じになる。

↓

設定後 **Next >**をクリックする。

↓

解析に使用するセンサーグラムを選択する。



Include	Curve	Fc	Spot	Ligand	Spot Setting

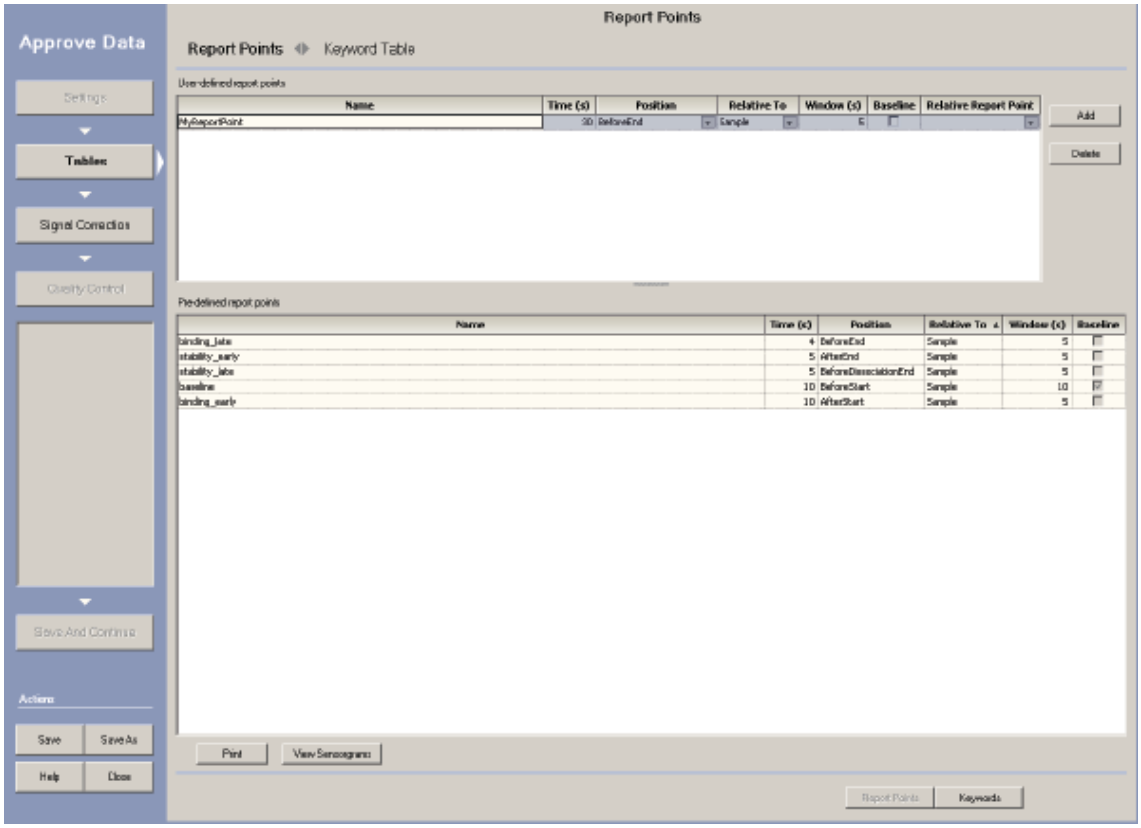
Include：評価に使用するものにチェックを入れる。
Curve　：センサーグラム（フローセル、スポットの順で表示される。）
Fc　　：フローセル番号
Spot　：スポット番号
Ligand：リガンド名
Spot Setting：
　Reference Subtracted（固定化スポット － リファレンススポット）Reference（リファレンススポット）
　Active（固定化スポット）

データの選択、除外は下記ボタンにて行う。

Tables をクリックする。

↓

Tables レポートポイントの追加と入力情報の変更を行う。
レポートポイントはセンサーグラム上のある時間におけるレスポンス（RU）を記録する機能。基本的な位置は予め記録されている。（170 ページの補足１１参照）追加で記録する場合は 171 ページの補足 12 を参照のこと。
またサンプル名、濃度等の情報を変更する場合には 173 ページの補足１３を参照のこと。



Signal Correction をクリックする。

↓

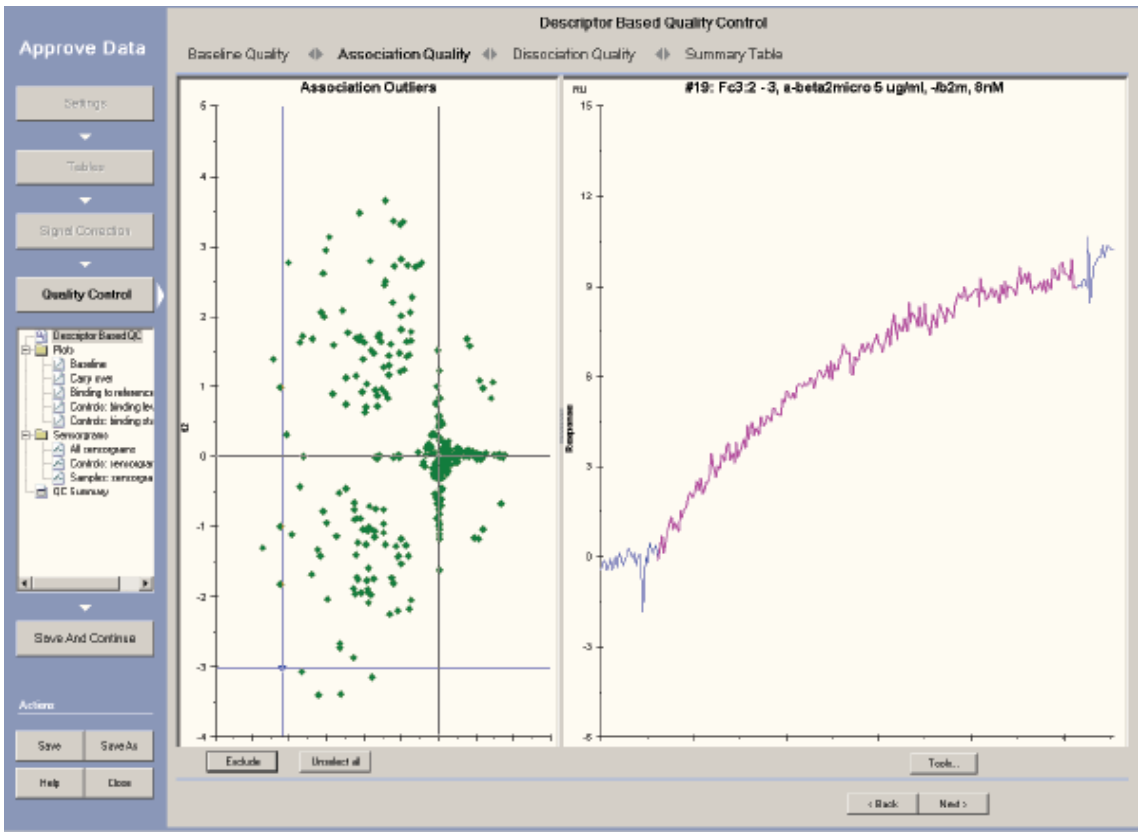
Signal Correction 各種補正を行う（174 ページの補足 14 参照）。

↓

Quality Control をクリックする。

↓

Quality Control データのチェックを行う。（詳細は 179 ページの補足１５参照）



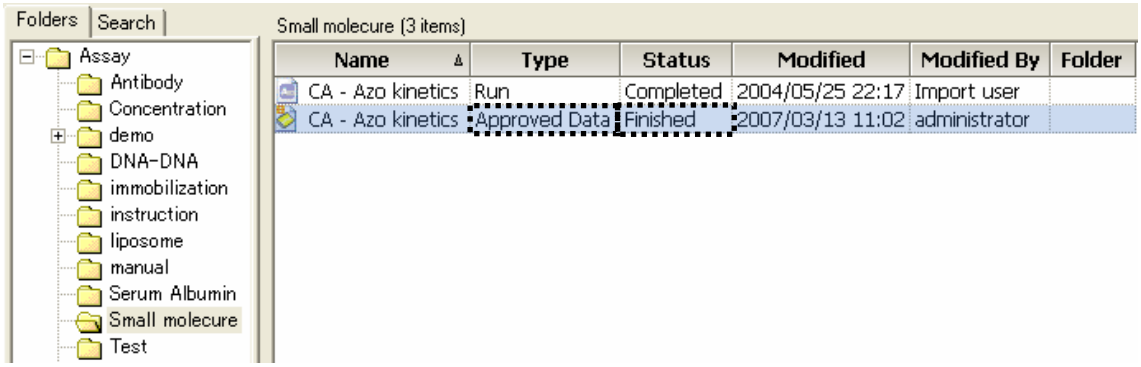
この時点でレポートポイントのデータをテキスト形式で保存することができる。
（保存方法とデータの編集は 185 ページの補足 16 を参照のこと。）

↓

Save and Continue をクリックする。

↓

保存先のフォルダを指定し、ファイル名を入力して保存する。

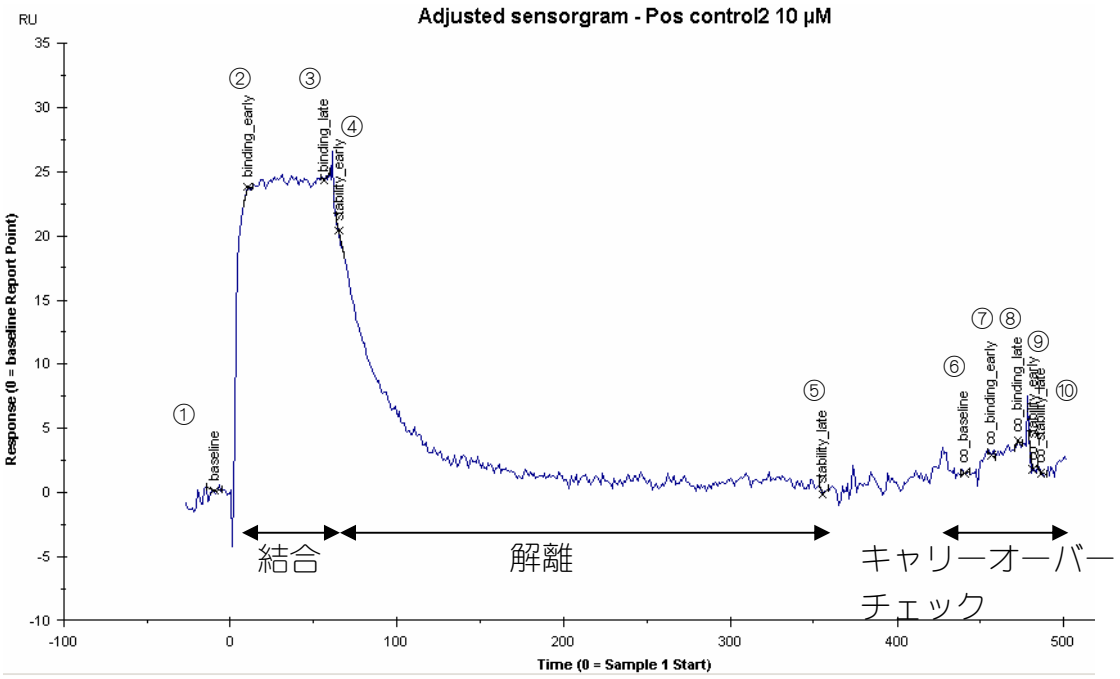


保存したデータは Type が"Approved Data"に、Status が"Finished"になる。
引き続き目的別解析を行う。

補足１１　レポートポイントの位置

スクリーニングの評価はレポートポイントの数値を使って行うため、レポートポイント名とその位置を把握しておくことは重要である。

Report Points ウィンドウ左下の **View Sensorgrams** をクリックするとデフォルトの位置が表示される。



＜デフォルトの設定＞

アナライト添加領域

①baseline　：アナライト添加開始の 10 秒前
②binding_early　：アナライト添加開始の 10 秒後
③binding_late　：アナライト添加終了の 4 秒前
④stability_early　：アナライト添加終了の 5 秒後
⑤stability_late　：解離終了の 5 秒前

キャリーオーバーチェック領域

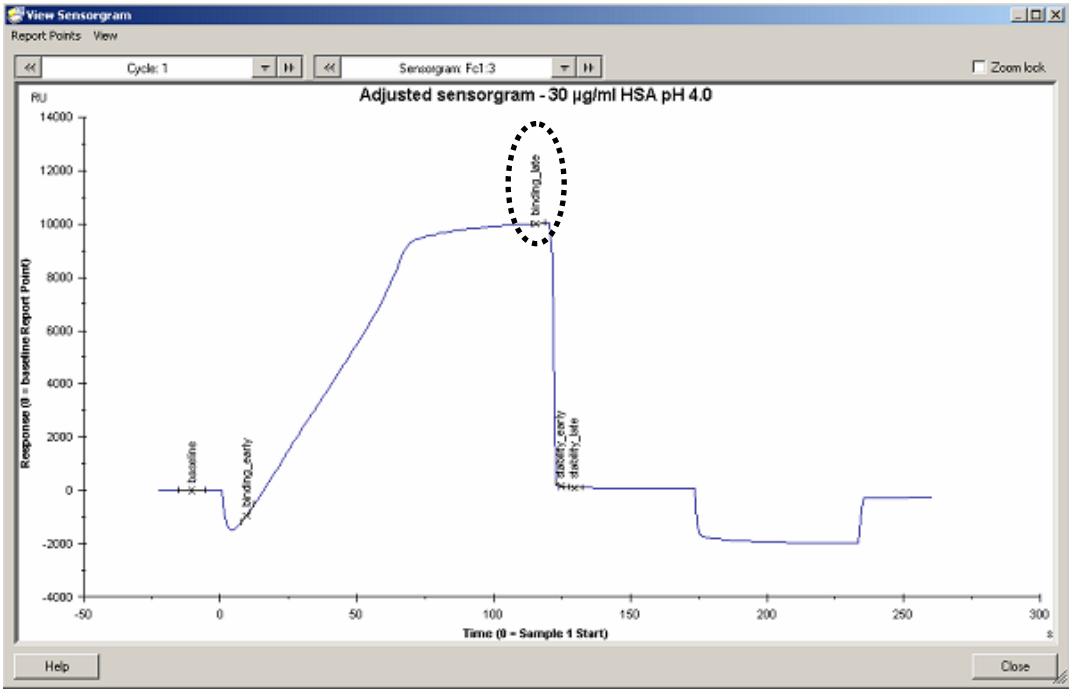
（Carry-over の測定を行った場合に表示される。）

①co_baseline　：ランニング緩衝液添加開始の 6 秒前
②co_binding_early　：ランニング緩衝液添加開始の 10 秒後
③co_binding_late　：ランニング緩衝液添加終了の 10 秒前
④co_stability_early　：ランニング緩衝液添加終了の 5 秒後
⑤co_stability_late　：解離終了の 5 秒前

補足 12　レポートポイントの追加

レポートポイントとはセンサーグラム上の任意の時間におけるレスポンス（RU）である。デフォルトとして Pre-defined report points 欄に予め登録されるが追加で設定することも可能である。

View Sensorgrams をクリックするとデフォルトのレポートポイントの位置を確認することができる。

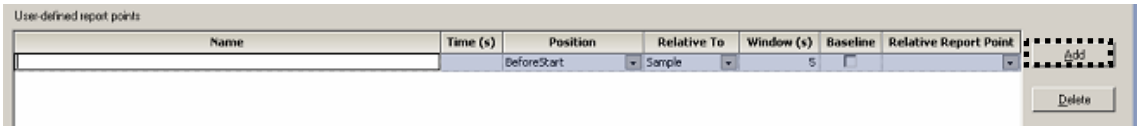


＜レポートポイントの追加＞

Report Points ウィンドウ内 User-defined report points の **Add** をクリックする。

↓

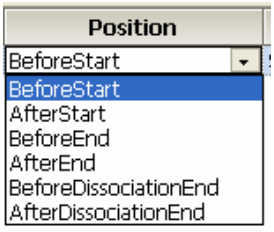
レポートポイントの設定カラムが表示される。



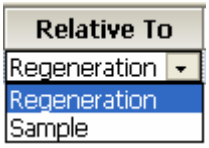
Name　：レポートポイントの名称を入力。（最大 30 文字）

Time　：リファレンスポジション（表中の Position）からの時間を入力。

Position　：レポートポイントの位置を選択。



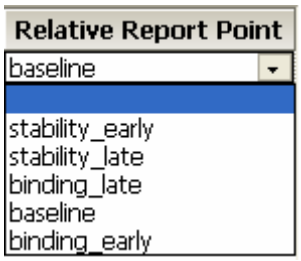
Relative To: 基準となる測定動作を選択。



Window　：レポートポイントの幅を入力する。(“5”と入力すればそのレポートポイントの数値は 5 秒間の平均値となる。)

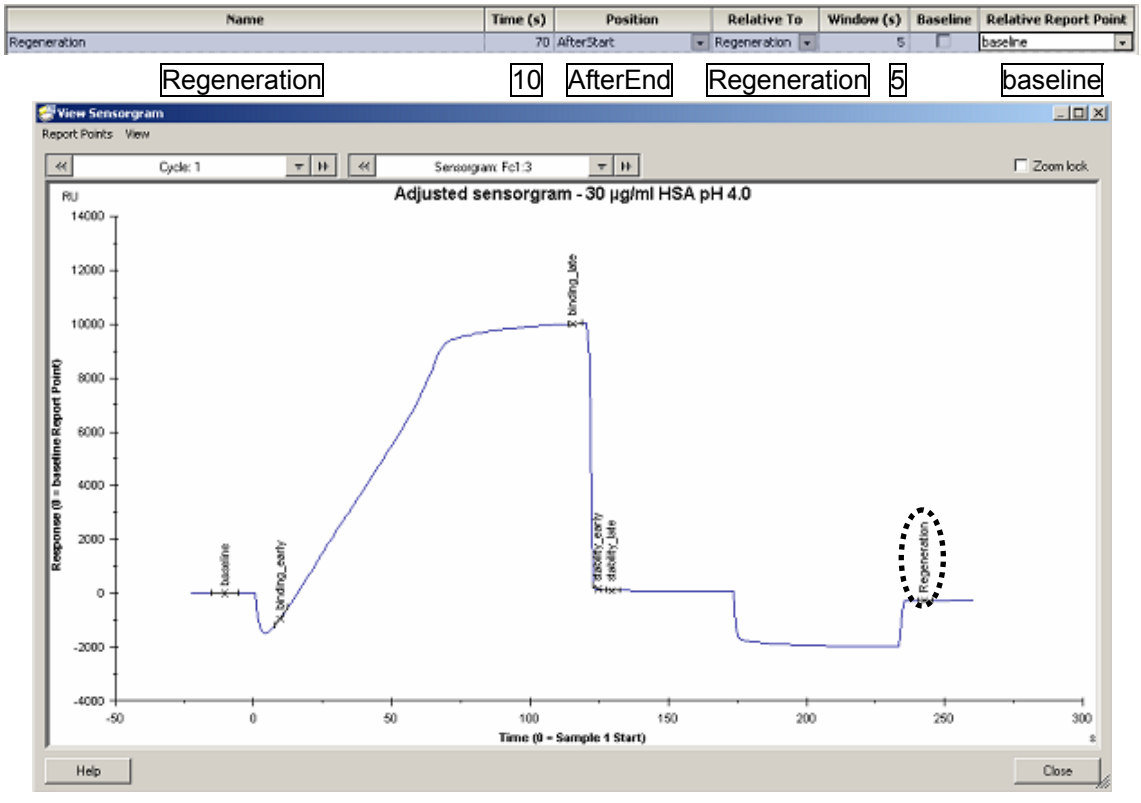
Baseline　：設定するレポートポイントの相対値を 0 にする。

Relative report point　：選択したレポートポイントからの相対値を表示する。



↓

例) 前ページのセンサーグラムの再生溶液添加終了 10 秒後に”Regeneration”というレポートポイントを追加し、レポートポイント”baseline”からの相対値を取得する場合。



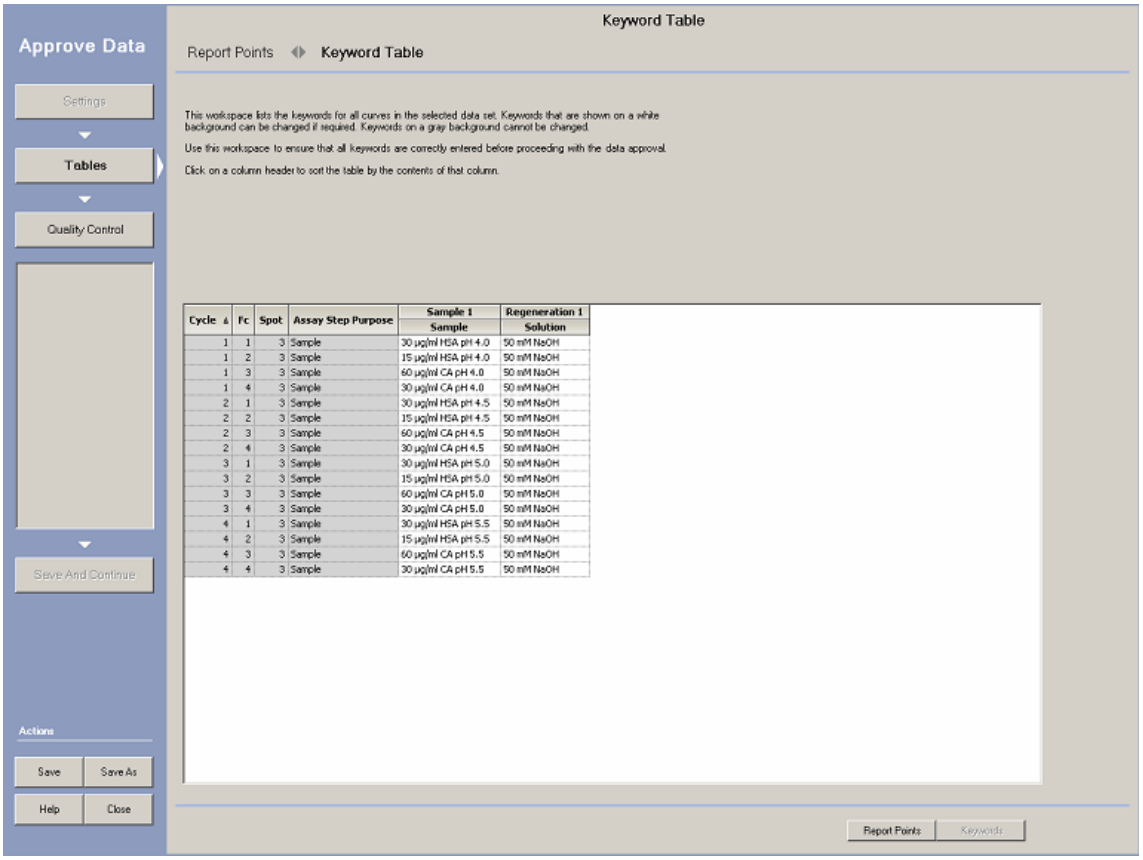
補足１３　サンプル名、濃度等の再入力

サンプル名、濃度、試薬等の入力を変更する場合に使用する。

Report Points ウィンドウ右下の **Keywords** をクリックする。

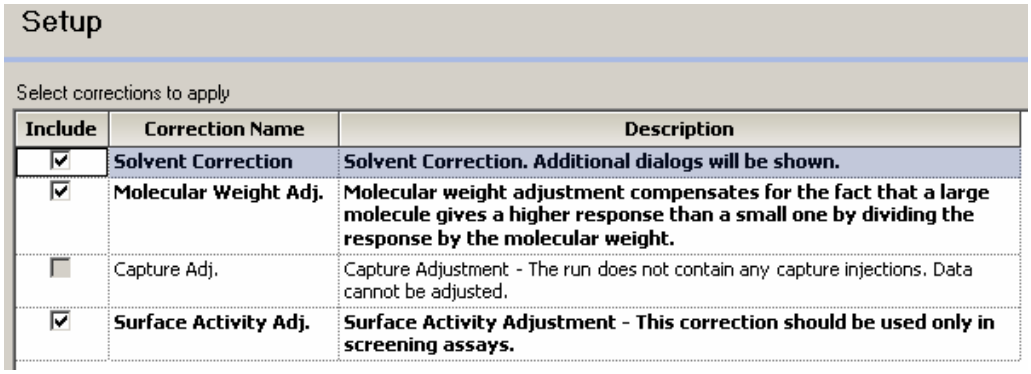
↓

表中白地の欄は再入力可能。スペルミス等があれば修正する。



補足 14　データ補正

データ補正は 4 種類ある。使用したメソッドによって補正できる項目は異なる。補正可能な項目のみ **Include** 欄にチェックを入れることができる。



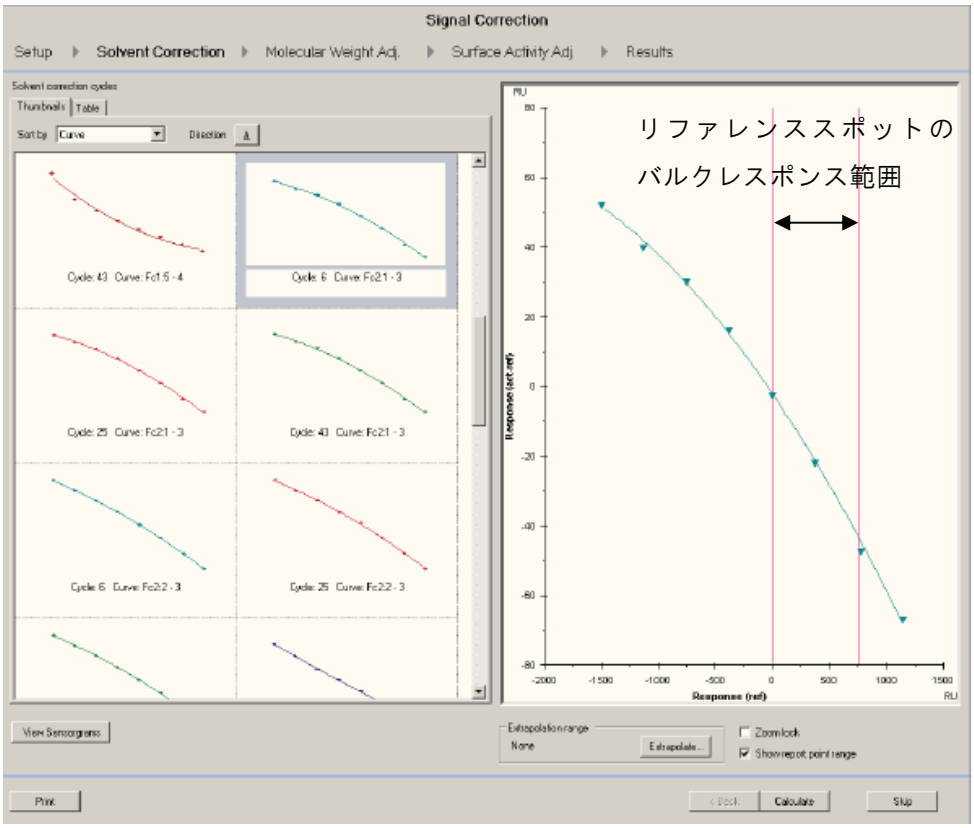
Solvent Correction

低分子化合物アナライトを測定した際の溶媒補正。

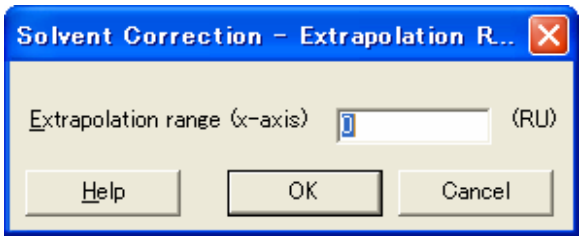
Solvent Correction のチェックを確認し、**Next >**をクリックする。

↓

左ウィンドウに各フローセル、スポットにおける測定サイクルごとの検量線が表示され、選択したものが右ウィンドウに拡大表示される。



右ウィンドウの検量線にはリファレンススポットのバルクレスポンスの範囲が表示されている。検量線内におさまっていることを確認する。
わずかに外れている場合には **Extrapolate...**をクリックする。

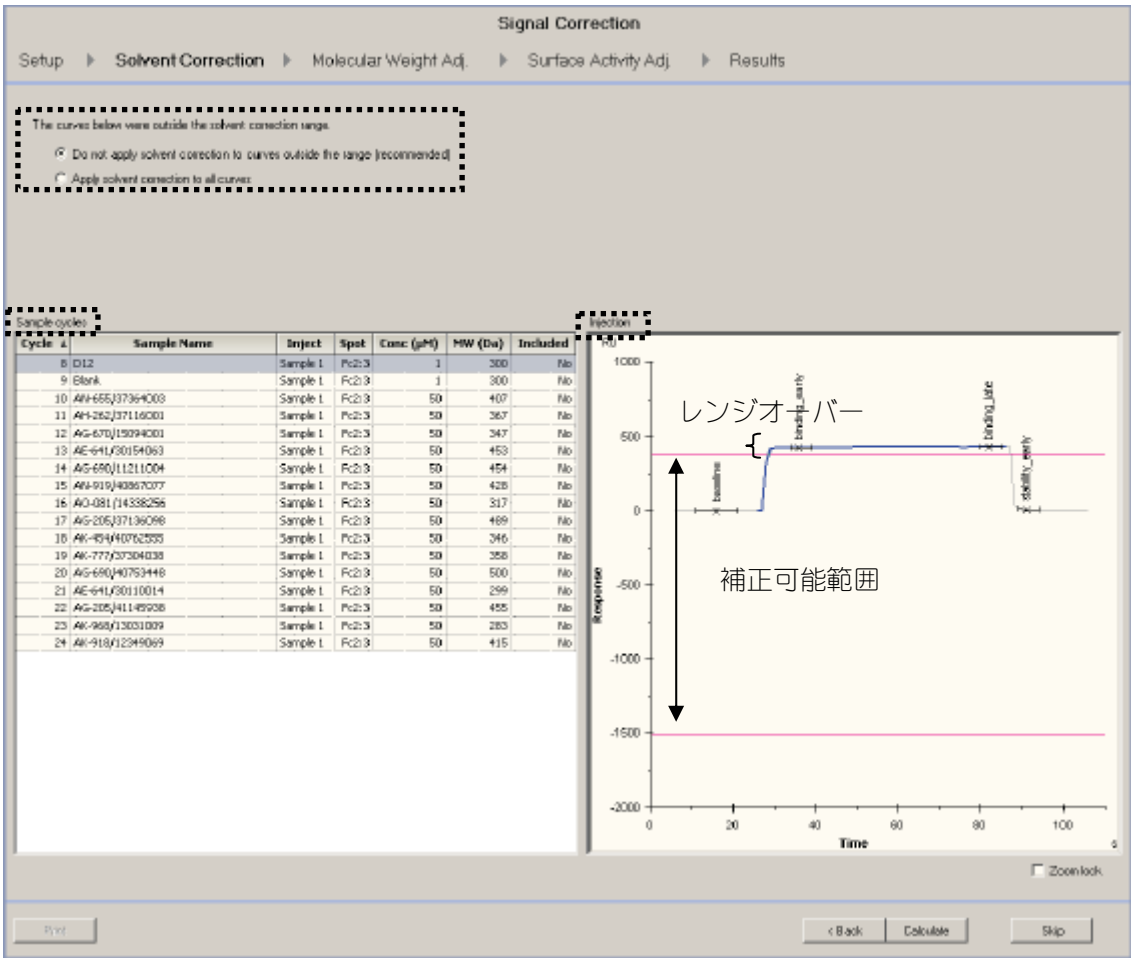


Extrapolation range(x-axis) に入力した数値だけ検量線を拡張することができる。

Calculate をクリックする。

↓

検量線から外れたデータは下記ウィンドウに表示される。



Sample cycles に範囲外のデータが表示され、Injection のウィンドウにそのセンサーグラムと補正可能範囲が表示される。

範囲外のデータを補正しない場合は

Do not apply solvent correction to curves outside the range (recommended)

にチェックを入れる。

↓

Calculate をクリックする。

↓

補正計算が終了する。

レポートポイントデータの補正

●Molecular Weight Adj.

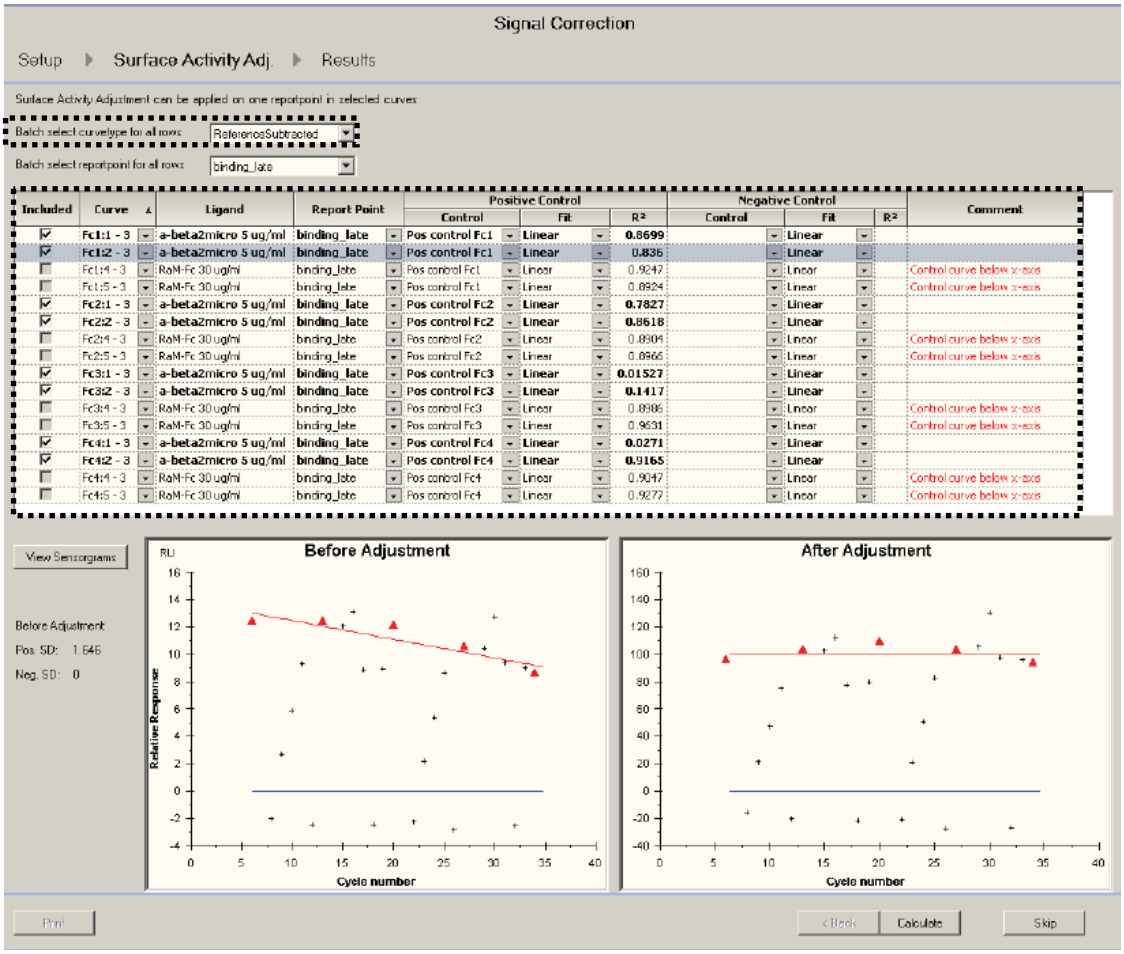
結合レスポンスを分子量で除し 100 を掛ける。（RU/Da *100）
分子量の異なるアナライトの結合を結合量で比較する場合に使用する。
（注意）メソッド作成時にアナライトの分子量入力が必要。

●Capture Adj.

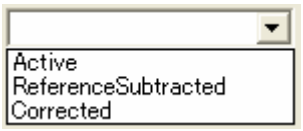
キャプチャー法でリガンドを固定化した際に、アナライトの結合レスポンスをキャプチャー量で除し、キャプチャー量差による結合レスポンスの差を補正する。

●Surface Activity Adj.

コントロールサンプルの結合レスポンスの推移からアナライトの結合レスポンスを補正する。各レスポンスはネガティブコントロールのレスポンスを 0、ポジティブコントロールのレスポンスを 100 とした相対値として計算される。
ネガティブコントロールを測定しない場合には 0RU とポジティブコントロールのレスポンスを 100 とした相対値として計算される。

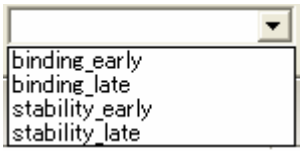


Batch select curvetype for all rows
補正するセンサーグラムの種類を選択する。



Active　：固定化スポットのデータ
ReferenceSubtracted　：固定化スポット － リファレンススポットのデータ
Corrected　：補正データ

Batch select reportpoint for all rows
補正するレポートポイントを選択する。



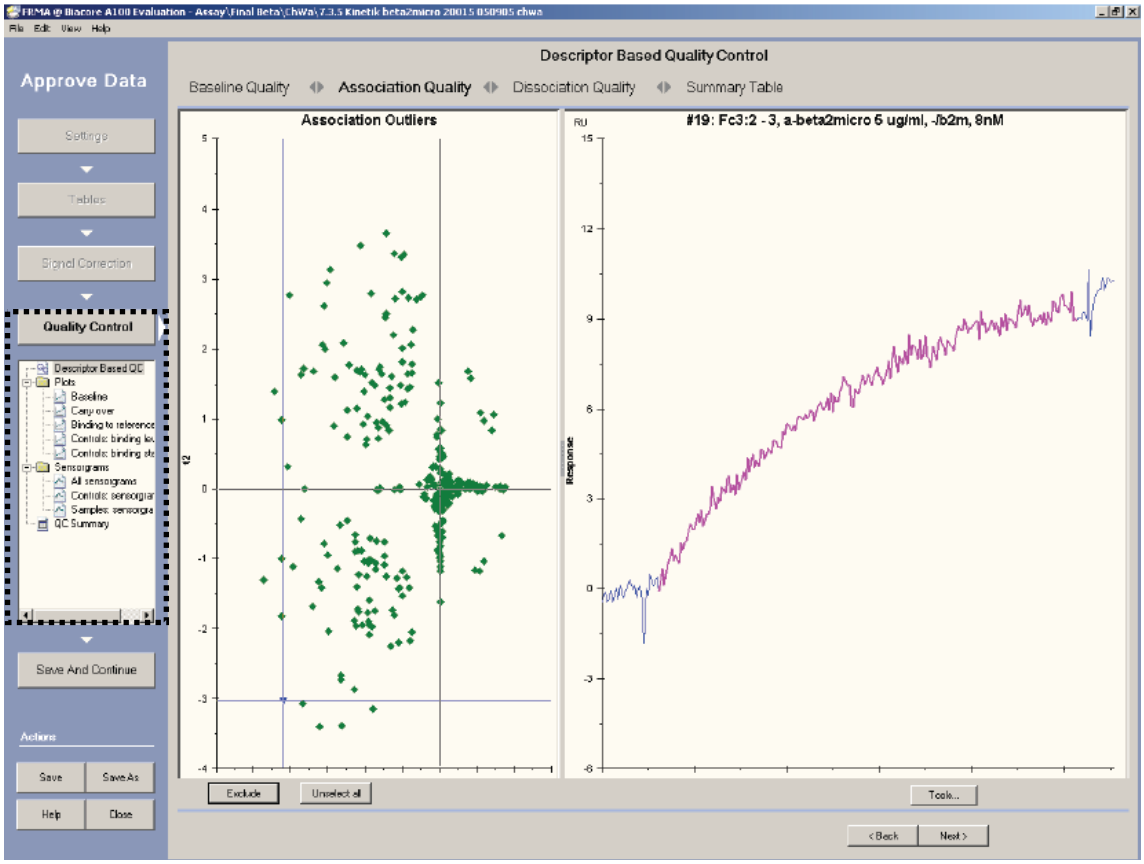
また中央の表で下記設定を行う。
・補正に使用するレポートポイントの選択
・補正に使用するコントロールサンプルの選択
・フィッティングアルゴリズムの選択

ポジティブコントロールのレスポンスが 0 以下であると Comment 欄に
“ **Control curve below x-axis** “と表示される。
（注意）
補正はあくまでもコントロールサンプルの規則的なレスポンス変化に対して行うものであり、ランダムにプロットされているような場合は補正する意味はない。

補足１５　データチェック（Quality Control）

膨大な数のセンサーグラムから乱れのあるセンサーグラム（空気の混入、ドリフト）を効率的に削除する。

Approve Data ステップの **Quality Control** で行う。



QC として３つの手法がある。

Ａ）　Descriptor-based QC

Ｂ）　Plot-based QC

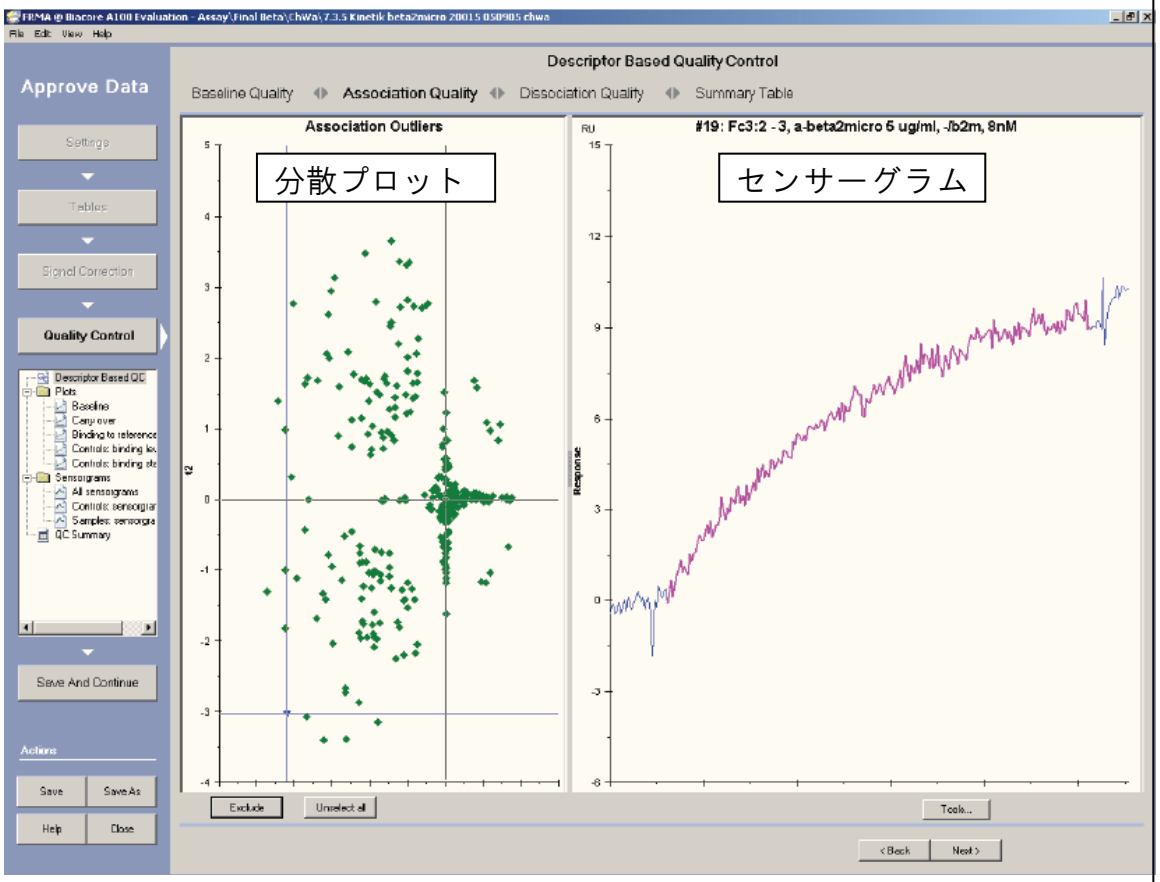
Ｃ）　Sensorgram-based QC

A）**Descriptor-based QC**

各センサーグラムのベースライン領域(Baseline Quality)、結合領域(Association Quality)、解離領域(Dissociation Quality)の一定範囲を主成分分析という統計学的手法で解析する。

画面左側に分散プロット、右側にその領域のセンサーグラムが表示される。

1 プロットが 1 センサーグラムに相当する。



＜データの削除＞

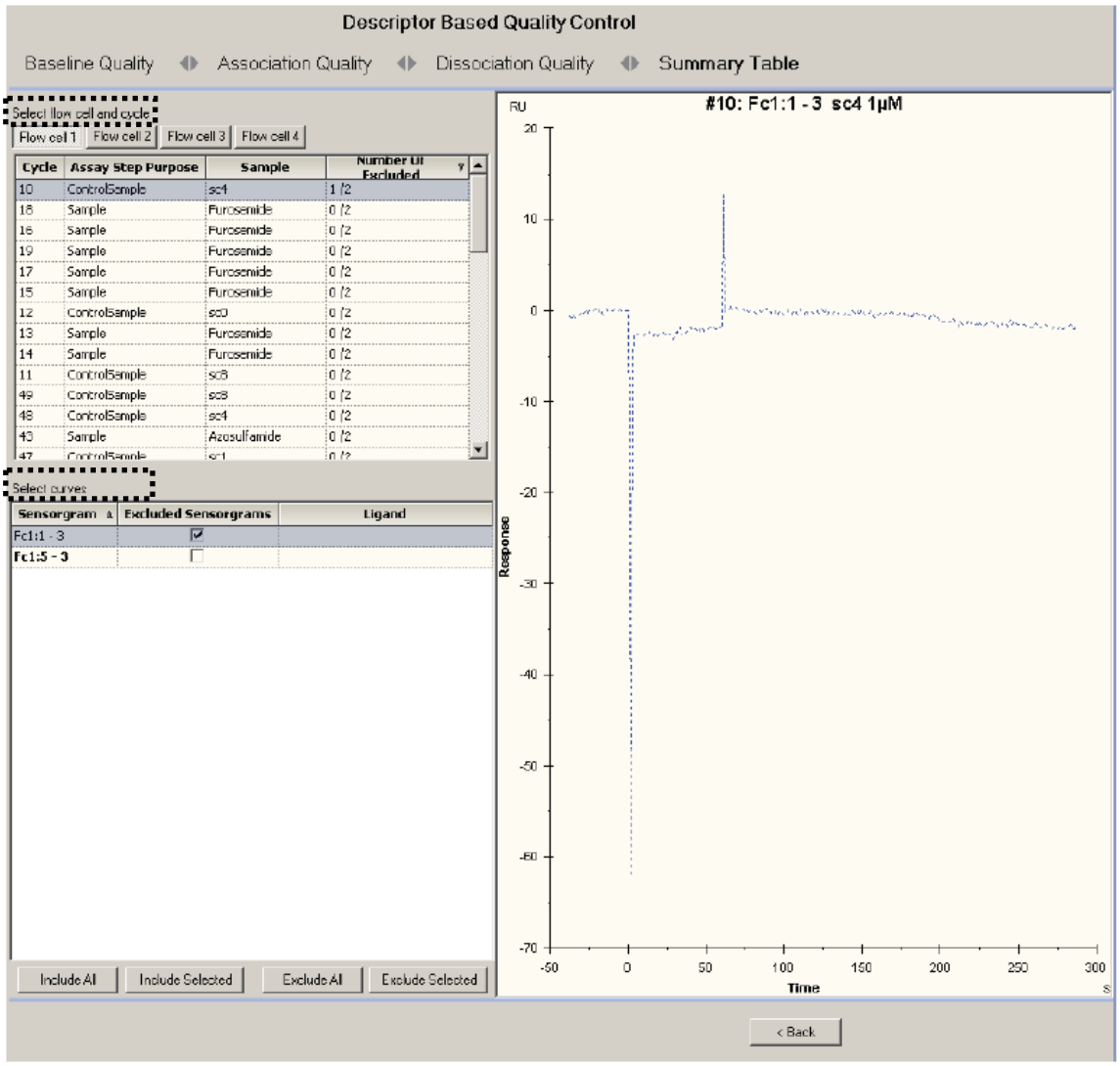
分散プロット内の集団で最も外れている点が青線で結ばれ青塗り表示される。またセンサーグラムウィンドウ内で左ダブルクリックするとそのセンサーグラムの全体像が確認できる。

削除する場合には左下の **Exclude** をクリックする。削除すると 2 番目に外れている点が選択されるので同様に評価する。この作業を繰り返し、乱れが認められなくなった時点で右下の **Next >**をクリックする。

この作業を **Baseline Quality→Association Quality→Dissociation Quality** の順で実施する。

↓

Summary Table



Select flow cell and cycle

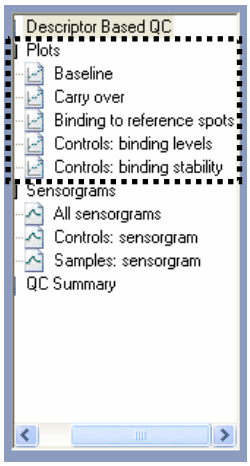
フローセル、サイクルごとに除外されたセンサーグラムを確認することができる。クリックするとセンサーグラムが表示される。除外されたものは点線表示される。

Select curves

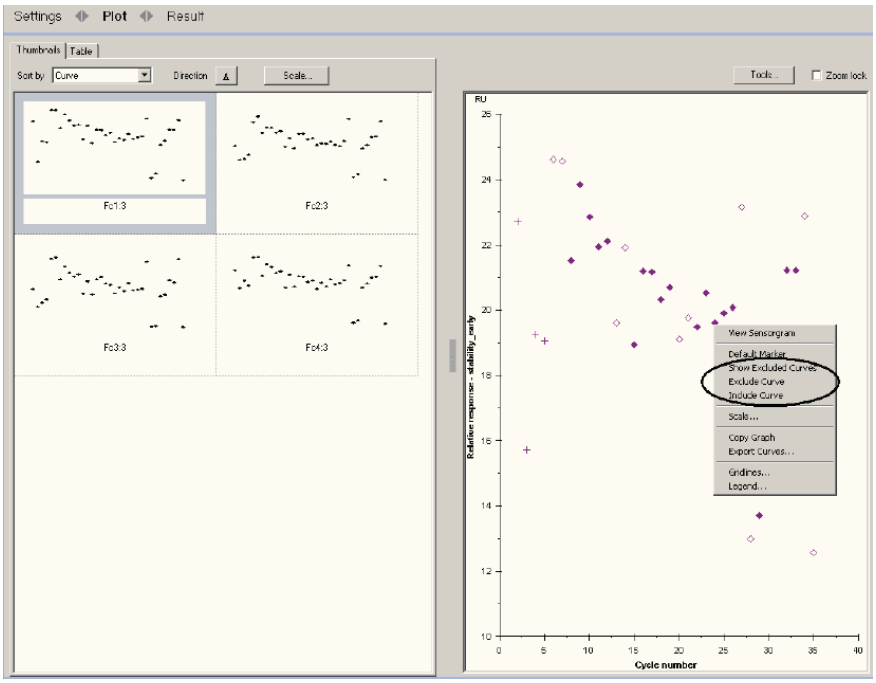
Select flow cell and cycle で選択したセンサーグラムのリストが表示される。
除外したものには **Excluded Sensorgrams** にチェックが入っている。
解析対象に入れる場合にはチェックをはずす。

B）**Plot-based QC**

レポートポイントを用いて評価する。表示されるレポートポイントの種類は測定プログラムにより異なる。評価するプロットを選択する。

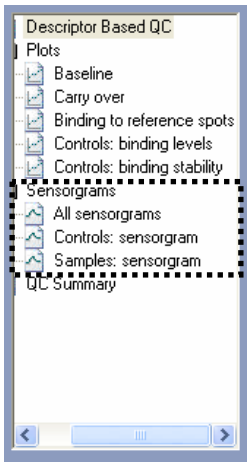


画面左半分に各フローセル、スポットのプロットが表示される。着目するフローセル・スポットを選択すると右に拡大表示される。削除するプロットにカーソルを合わせ右クリックする。センサーグラムを確認する場合は **View Sensorgram** を選択する。削除する場合は **Exclude Curve** を選択する。



C）Sensorgram-based QC

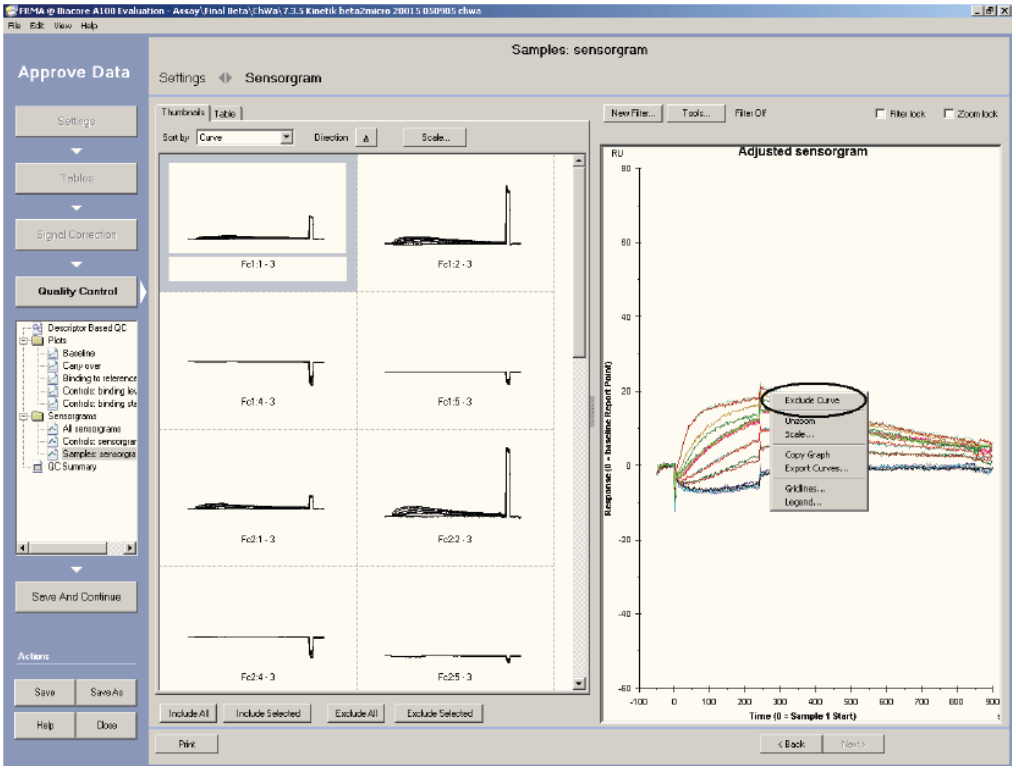
センサーグラムの形状を見て除外するデータを選択する。



↓

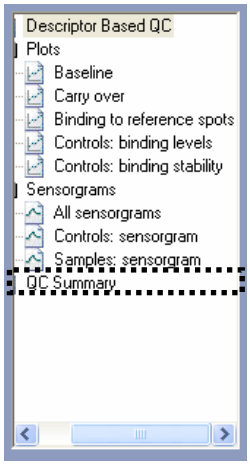
画面左半分に各フローセル・スポットのセンサーグラムが表示される。選択すると右側にそのセンサーグラムが拡大表示される。削除するセンサーグラムにカーソルを合わせ右クリックする。

Exclude Curve を選択するとそのセンサーグラムが点線表示される。

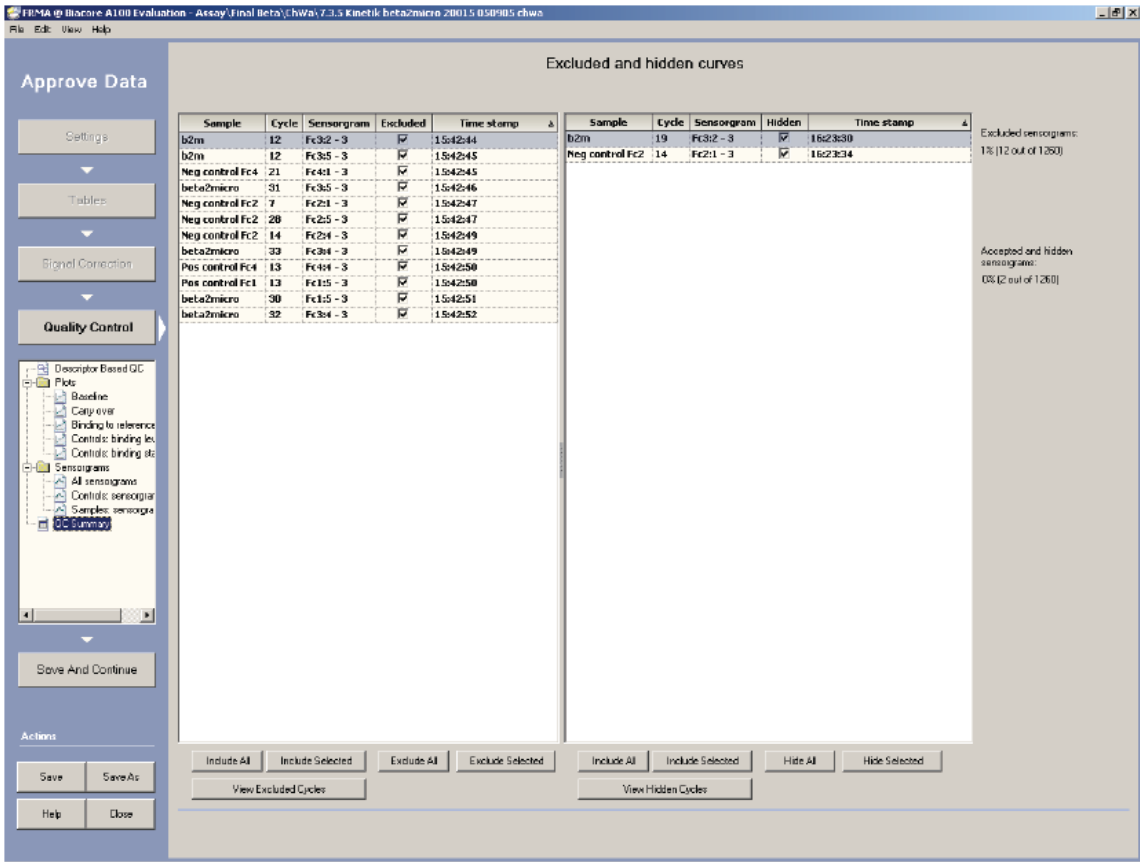


QC Summary

QC の結果が表示される。この段階で除外を解除することもできる。

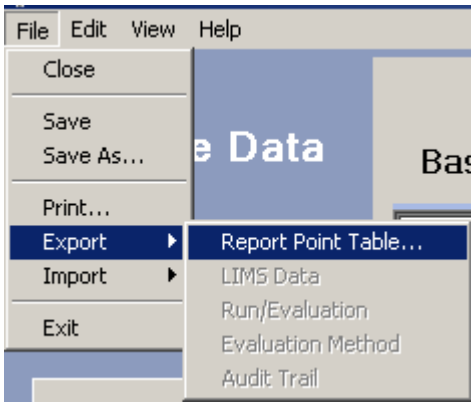


↓



補足 16　レポートポイントデータの編集

Approved Data のレポートポイントデータをテキスト形式で保存し
Microsoft Excel 等で評価することができる。



Menu→File→Export→Report Point Table...
を選択しファイル名をつけて保存する。

例）Microsoft Excel で開いた結果

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	Cycle	Fc	Spot	CurveNa	DiodeRo	Time	Window	AbsResp	SD	Slope	LRSD	Quality
2	1	3	15	Fc3:5 - 3	45	32	10	10042.06	0.272364	−0.0432	0.244163	Ok
3	1	3	15	Fc3:5 - 3	45	52	5	10040.91	0.398818	0.082143	0.411461	Ok
4	1	3	15	Fc3:5 - 3	45	158	5	10042	0.10712	−0.02813	0.10432	Ok
5	1	3	15	Fc3:5 - 3	45	167	5	10042.45	0.53064	−0.25619	0.254594	Ok
6	1	3	15	Fc3:5 - 3	45	757	5	10041.57	0.213477	0.017355	0.235898	Ok
7	1	2	10	Fc2:5 - 3	197	32	10	10940.87	0.321033	0.064702	0.25169	Ok
8	1	2	10	Fc2:5 - 3	197	52	5	10937.96	0.195167	0.036719	0.20424	Ok
9	1	2	10	Fc2:5 - 3	197	158	5	10938.83	0.196332	0.035379	0.206656	Ok
10	1	2	10	Fc2:5 - 3	197	167	5	10939.92	0.491286	0.162835	0.430927	Ok
11	1	2	10	Fc2:5 - 3	197	757	5	10939.26	0.222532	−0.06607	0.206886	Ok
12	1	1	1	Fc1:1 - 3	172	32	10	4329.05	0.314064	0.057457	0.263146	Ok
13	1	1	1	Fc1:1 - 3	172	52	5	4330.47	0.196957	−0.04487	0.199206	Ok
14	1	1	1	Fc1:1 - 3	172	158	5	4326.928	0.13249	0.011384	0.146203	Ok
15	1	1	1	Fc1:1 - 3	172	167	5	4326.039	0.178552	−0.08711	0.081568	Ok
16	1	1	1	Fc1:1 - 3	172	757	5	4322.549	0.192608	0.007199	0.214815	Ok
17	1	4	20	Fc4:5 - 3	103	32	10	9598.023	0.512543	0.126634	0.309667	Ok
18	1	4	20	Fc4:5 - 3	103	52	5	9598.168	0.29444	0.077734	0.286238	Ok
19	1	4	20	Fc4:5 - 3	103	158	5	9597.32	0.219592	0.067969	0.200162	Ok
20	1	4	20	Fc4:5 - 3	103	167	5	9597.458	0.344315	0.015569	0.383576	Ok
21	1	4	20	Fc4:5 - 3	103	757	5	9596.316	0.197841	−0.07037	0.165114	Ok
22	1	3	11	Fc3:1 - 3	13	32	10	12644.98	0.330736	−0.02157	0.340371	Ok
23	1	3	11	Fc3:1 - 3	13	52	5	12648.52	0.314187	−0.06641	0.322643	Ok
24	1	3	11	Fc3:1 - 3	13	158	5	12644.83	0.329743	0.039174	0.359443	Ok

オートフィルター機能を使用して目的のデータを抽出する。

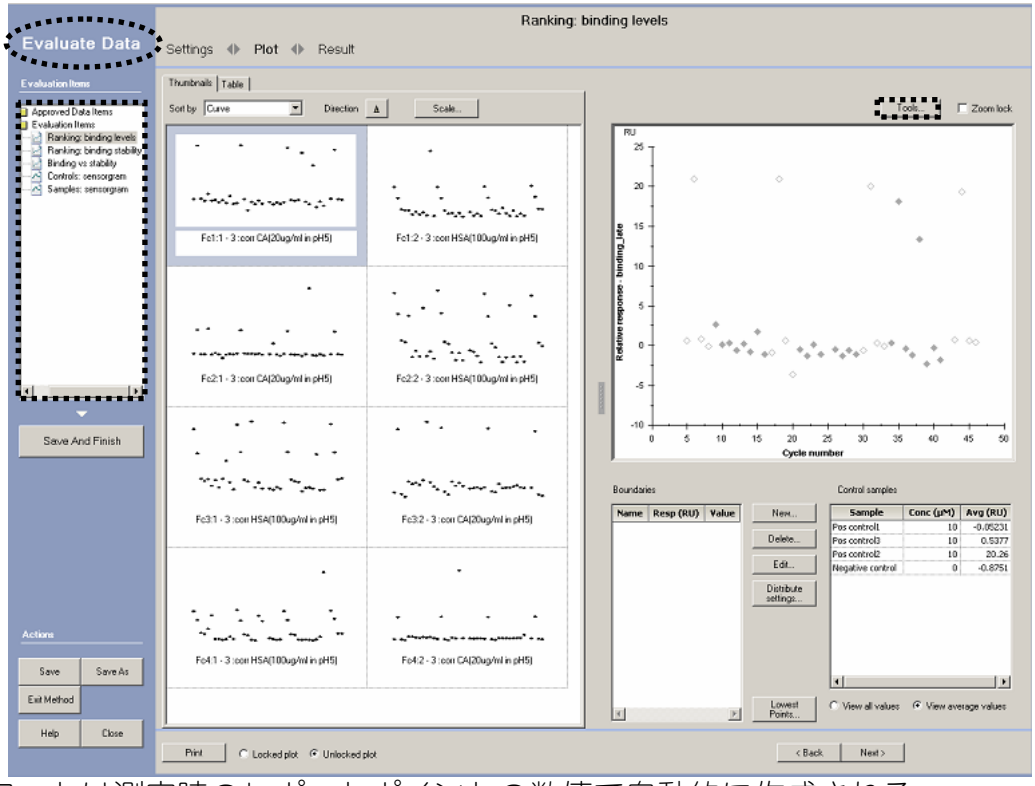
9-2.　目的別データ解析方法

解析はレポートポイントの数値を利用した各種プロットによる評価と、相互作用センサーグラムを解析し、反応速度定数や解離定数を算出する評価に大別される。解析は Approve Data を使用する。

9-2-1.　スクリーニング

解析テンプレート：Screening、Screening with capture

ナビゲーションパネルの Evaluation Items からプロット、センサーグラムを確認する。



プロットは測定時のレポートポイントの数値で自動的に作成される。
（任意にプロットを作成する場合には 189 ページの補足 17 を参照のこと。）

Ranking: binding levels

X：測定サイクル　Y：binding_late の数値

Ranking: binding stability

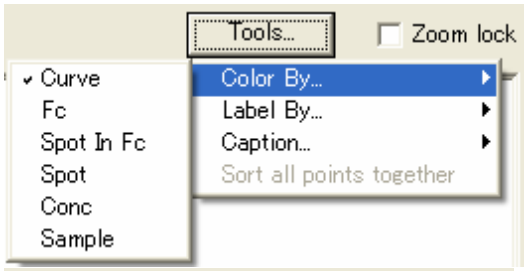
X：測定サイクル　Y：stability_early の数値

Binding vs stability

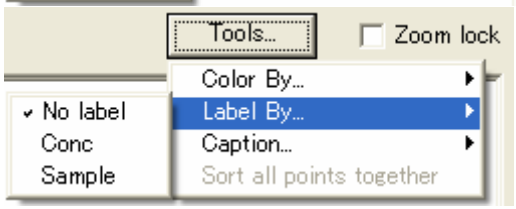
X：stability_early の数値　Y：binding_late の数値

Controls: sensorgram
コントロールサンプルのセンサーグラム
Samples: sensorgram
サンプルのセンサーグラム（任意にセンサーグラムを重ね書きする場合には194 ページの補足 18 を参照のこと。）

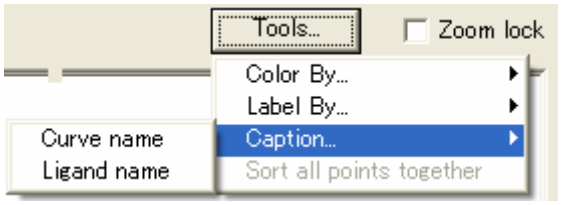
各プロットは **Tools...**で設定変更可能である。



Color By...
選択した項目ごとに色分け表示される。



Label By...
各プロットの上に選択した項目が表示される。



Caption...
各プロットに選択した項目のタイトルが表示される。

Next >をクリックする。

↓

全フローセル、スポットのレポートポイントの数値が表示される。

Included	Cycle	Curve	Y-Axis (binding_late)	X-Axis (Cycle number)	Ligand	Curve Marker	Conc	Sample
☑	7	Fc1:1 - 3 :corr	154.2	7	Donkey serum alb		1	Neg control
☑	7	Fc1:2 - 3 :corr	459.1	7	Guinea pig serum alb		1	Neg control
☑	7	Fc1:5 - 4 :corr	589.8	7	Porcine serum alb		1	Neg control
☑	7	Fc2:1 - 3 :corr	835.4	7	Rabbit serum alb		1	Neg control
☑	7	Fc2:2 - 3 :corr	317.2	7	Rat serum alb		1	Neg control
☑	7	Fc2:5 - 4 :corr	111.2	7	Human serum alb		1	Neg control
☑	7	Fc3:1 - 3 :corr	-45.9	7	Donkey serum alb		1	Neg control
☑	7	Fc3:2 - 3 :corr	572.9	7	Guinea pig serum alb		1	Neg control
☑	7	Fc3:5 - 4 :corr	295.6	7	Porcine serum alb		1	Neg control
☑	7	Fc4:1 - 3 :corr	684.9	7	Rabbit serum alb		1	Neg control
☑	7	Fc4:2 - 3 :corr	194.1	7	Rat serum alb		1	Neg control
☑	7	Fc4:5 - 4 :corr	279	7	Human serum alb		1	Neg control
☑	8	Fc1:1 - 3 :corr	251.3	8	Donkey serum alb		1	Neg control

各タイトルをクリックすることで、そのカラムのデータを昇順、降順あるいはアルファベット順にソートすることができる。

<テーブルデータをテキストファイルで保存する>
表中で右クリックし **Export Table** を選択する。
タブ区切りのテキスト形式データとして保存することができる。

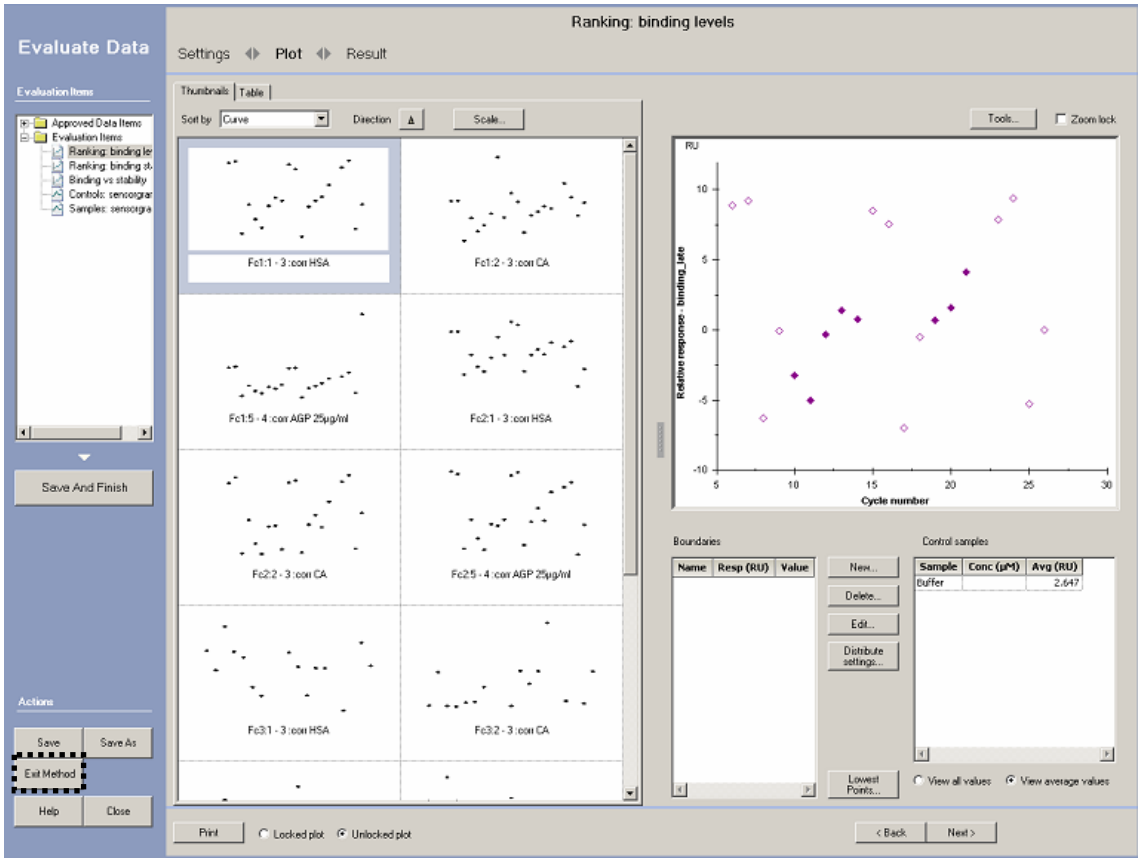
↓

解析結果を保存する。ナビゲーションパネルの **Save** もしくは **Save As** をクリックして保存した場合は、そのファイルを再度開いて再解析が可能である。
Save And Finish をクリックして保存した場合は、解析結果が固定されるため再解析することはできない。

解析結果の保存形式については 221 ページの補足 22 を参照のこと。

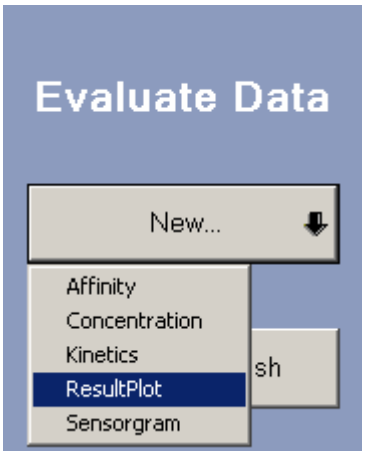
補足 17　新規プロットの作成

評価目的に応じて任意にプロットを作成することができる。



ナビゲーションパネルの **Exit Method** をクリックする。

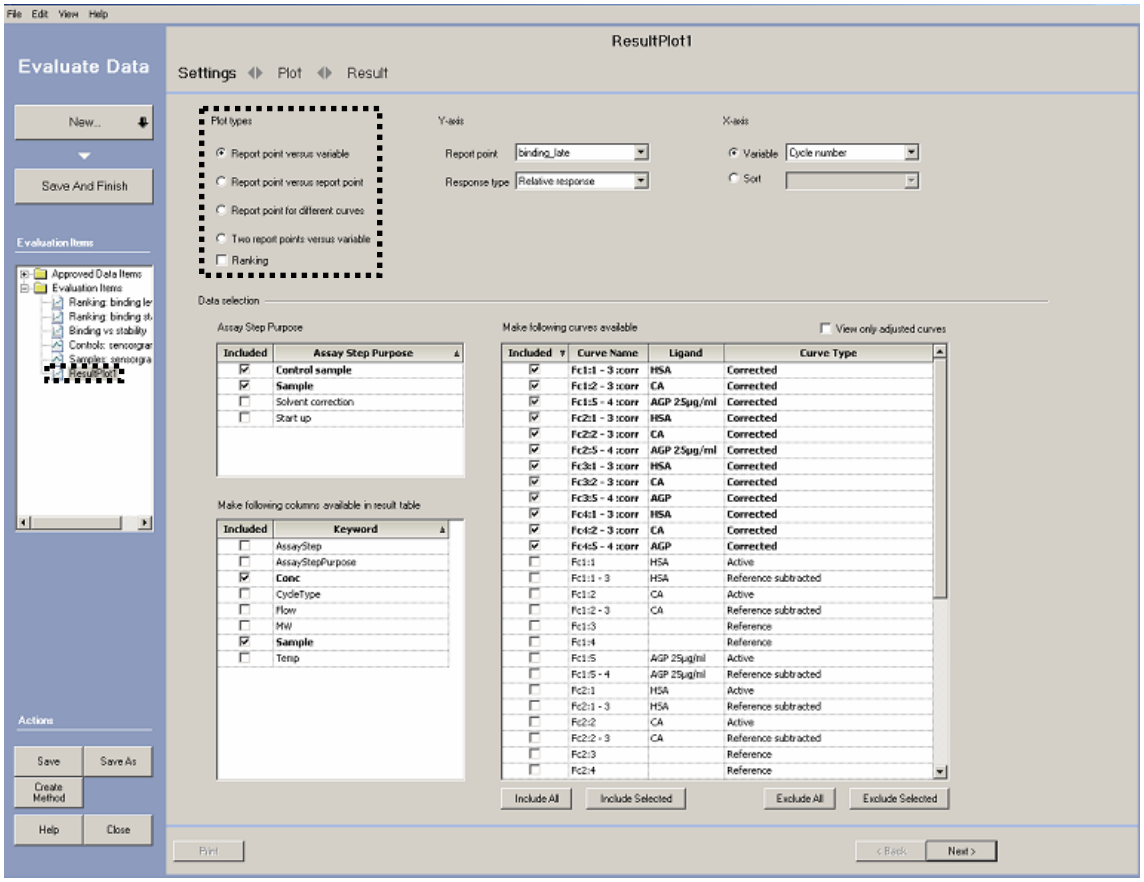
↓



ナビゲーションパネルの **New...**↓をクリックし **ResultPlot** を選択する。

↓

ナビゲーションパネルの Evaluation Items ウィンドウ内に **ResultPlot1** が追加される。必要に応じて表示名を変更する。

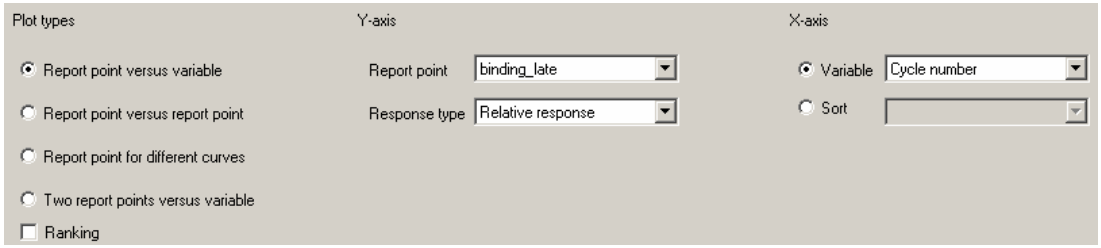


Plot types から作成するプロットタイプを選択する。

↓

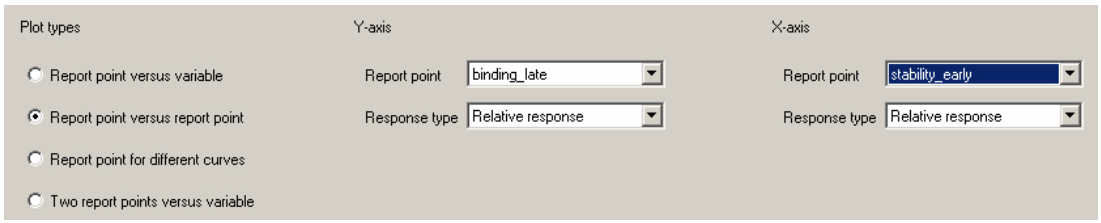
Report point versus variable

X-axis の Variable で選択した項目に対して Y-axis で選択したレポートポイントの数値をプロットする。Report point でプロットするレポートポイントを選択し、Response type から **Absolute response**（絶対値）、**Relative response**（相対値）、**Adjusted relative response**（Molecular Weight Adj.、Capture Adj.、Surface Activity Adj.で補正した値）、**Slope**（レポートポイントの傾き）のいずれかを選択する。



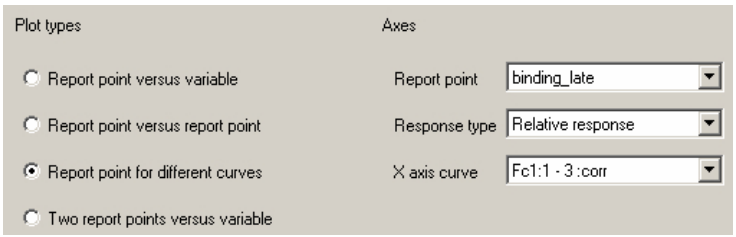
Report point versus report point

レポートポイント間のプロットを作成する。



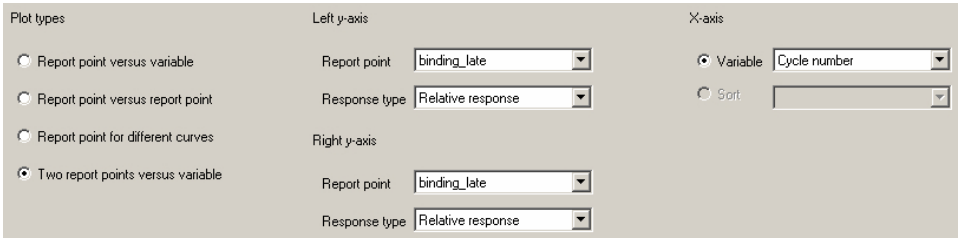
Report point for different curves

X axis curve で指定したセンサーグラムのレポートポイントに対して各センサーグラムのレポートポイントをプロットする。

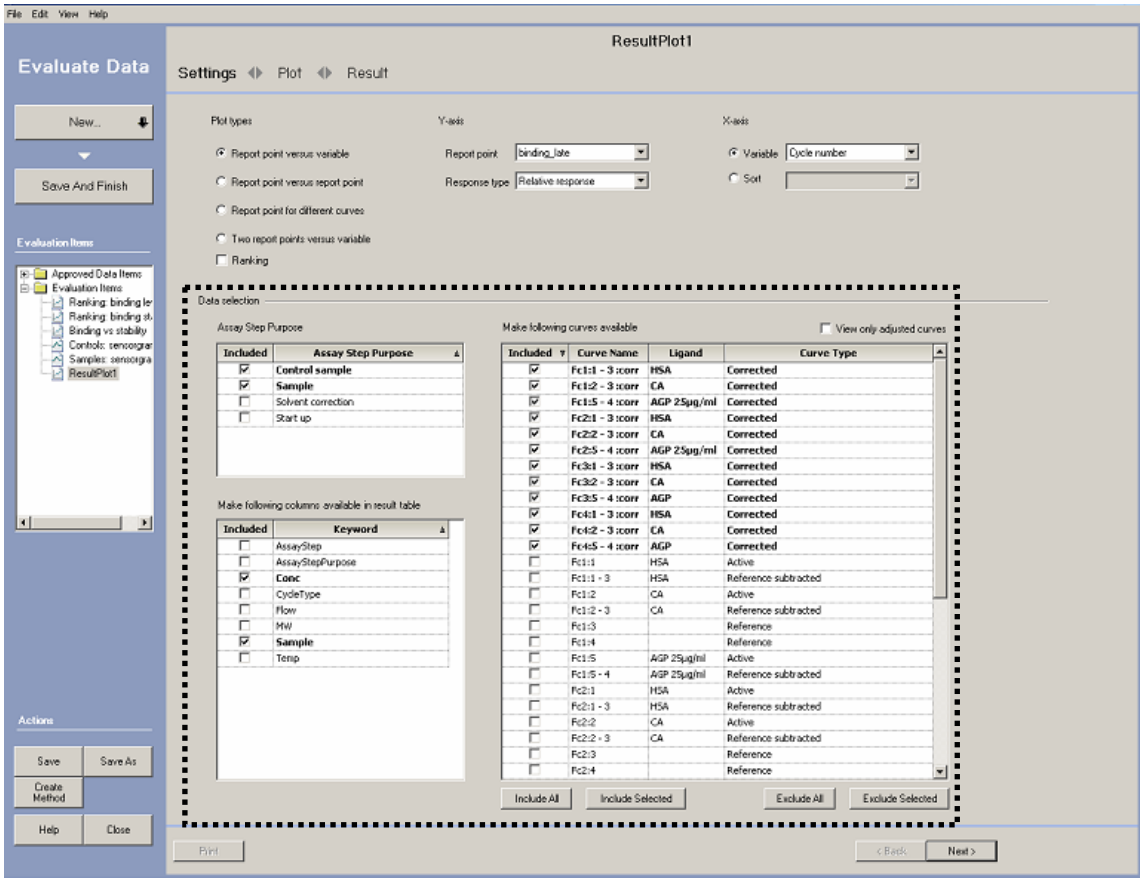


Two report points versus variable

X-axis の Variable で選択した項目に対して 2 種のレポートポイントを同時にプロットする。



Data selection でプロットするデータを選択する。



Assay Step Purpose

　プロットする測定ステップを選択する。

Make following columns available in result table

　結果シートに掲載する項目を選択する。

Make following curves available

プロットするセンサーグラムを選択する。

↓

Next >をクリックする。

↓

プロットが表示される。

Next >をクリックする。

↓

レポートポイントの数値が表示される。

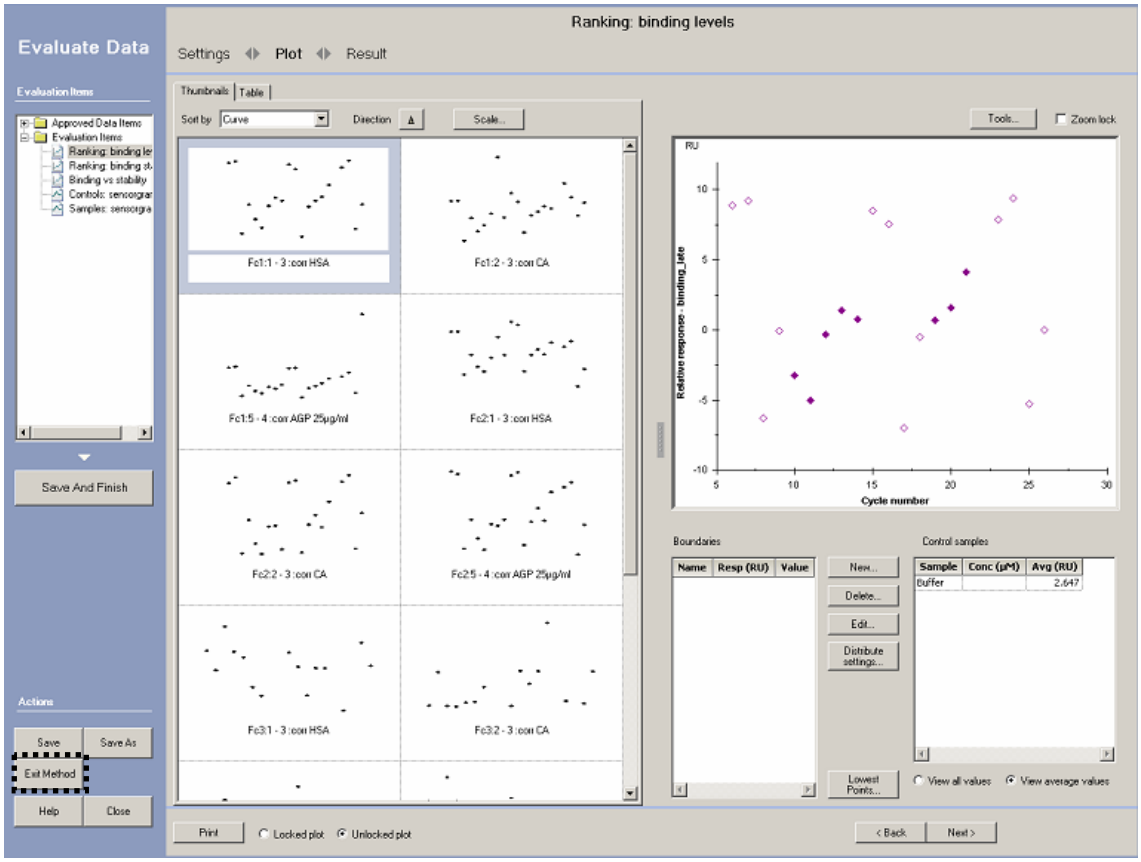
ResultPlot1

Settings ◆▶ Plot ◆▶ Result

Included	Cycle	Curve	Y-Axis (binding_late)	X-Axis (stability_early)	Ligand	Curve Marker	Conc	Sample
☑	6	Fc1:1 - 3 :corr	8.9	-0.6	HSA			Buffer
☑	6	Fc1:2 - 3 :corr	1.2	0.0	CA			Buffer
☑	6	Fc1:5 - 4 :corr	6.3	0.4	AGP 25µg/ml			Buffer
☑	6	Fc2:1 - 3 :corr	6.9	0.1	HSA			Buffer
☑	6	Fc2:2 - 3 :corr	2.6	0.4	CA			Buffer
☑	6	Fc2:5 - 4 :corr	4.0	0.6	AGP 25µg/ml			Buffer
☑	7	Fc1:1 - 3 :corr	9.1	-0.5	HSA			Buffer
☑	7	Fc1:2 - 3 :corr	1.2	0.1	CA			Buffer
☑	7	Fc1:5 - 4 :corr	6.6	0.4	AGP 25µg/ml			Buffer
☑	7	Fc2:1 - 3 :corr	7.0	0.7	HSA			Buffer
☑	7	Fc2:2 - 3 :corr	3.0	1.0	CA			Buffer
☑	7	Fc2:5 - 4 :corr	3.8	0.4	AGP 25µg/ml			Buffer
☑	8	Fc1:1 - 3 :corr	-6.3	-0.5	HSA			Buffer
☑	8	Fc1:2 - 3 :corr	-0.6	0.0	CA			Buffer
☑	8	Fc1:5 - 4 :corr	-1.9	0.1	AGP 25µg/ml			Buffer
☑	8	Fc2:1 -	-5.6	0.3	HSA			Buffer

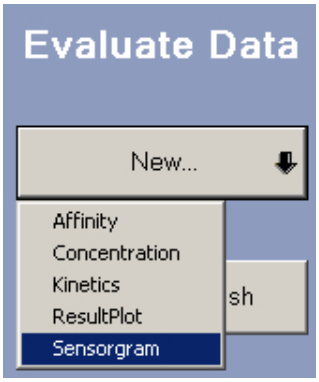
補足 18　センサーグラムの重ね書き

センサーグラムを重ね書きし、固定化スポットとリファレンススポットの差の比較や、フローセル間での比較を行う場合に用いる。



ナビゲーションパネルの **Exit Method** をクリックする。

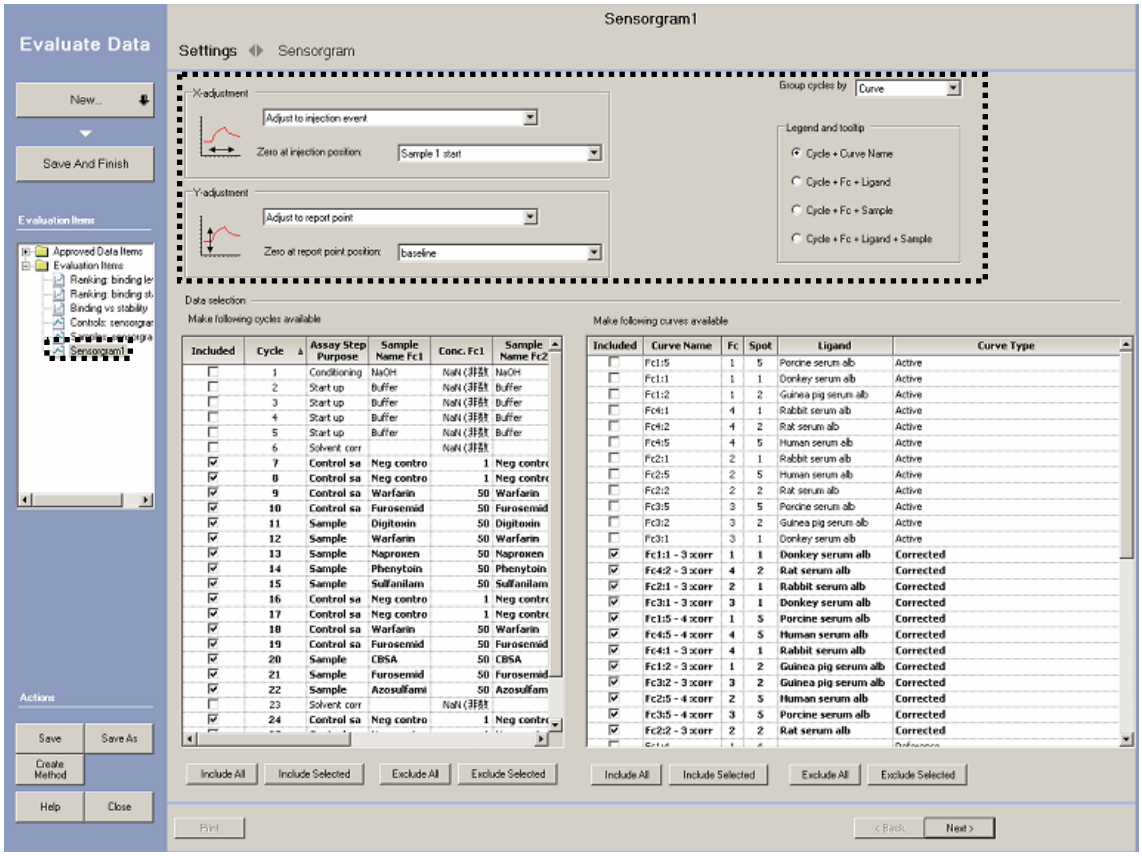
↓



ナビゲーションパネルの **New...**↓をクリックし **Sensorgram** を選択する。

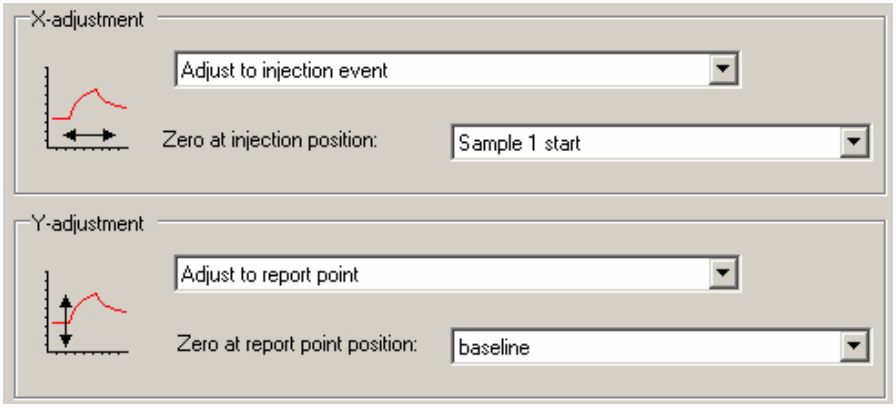
↓

ナビゲーションパネルの Evaluation Items ウィンドウ内に **Sensorgram1** が追加される。必要に応じて表示名を変更する。



↓

センサーグラムを重ね合わせる際の基準点を設定する。



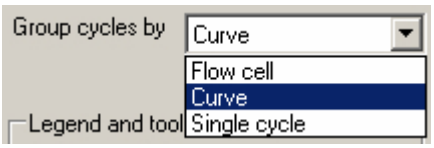
X-adjustment、Y-adjustment　：X 軸、Y 軸の基準点の設定
No adjustment　：設定なし
Adjust to report point　：レポートポイントでそろえる
Adjust to injection event　：インジェクション動作でそろえる

Zero at injection (report point) position; ：そろえる位置を選択する。

↓

Group cycles by

センサーグラムの重ね書き表示を設定する。



Flow cell　：各フローセルの全センサーグラムを重ね書きする

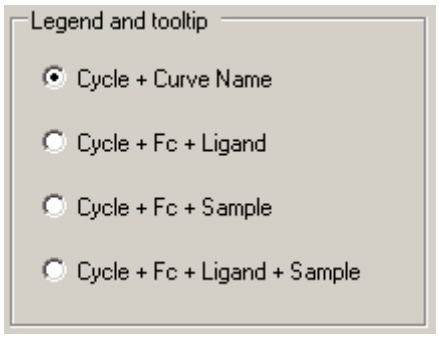
Curve　：各フローセルのスポットごとのセンサーグラムを重ね書きする

Single cycle　：全センサーグラムを 1 本ずつ表示する

↓

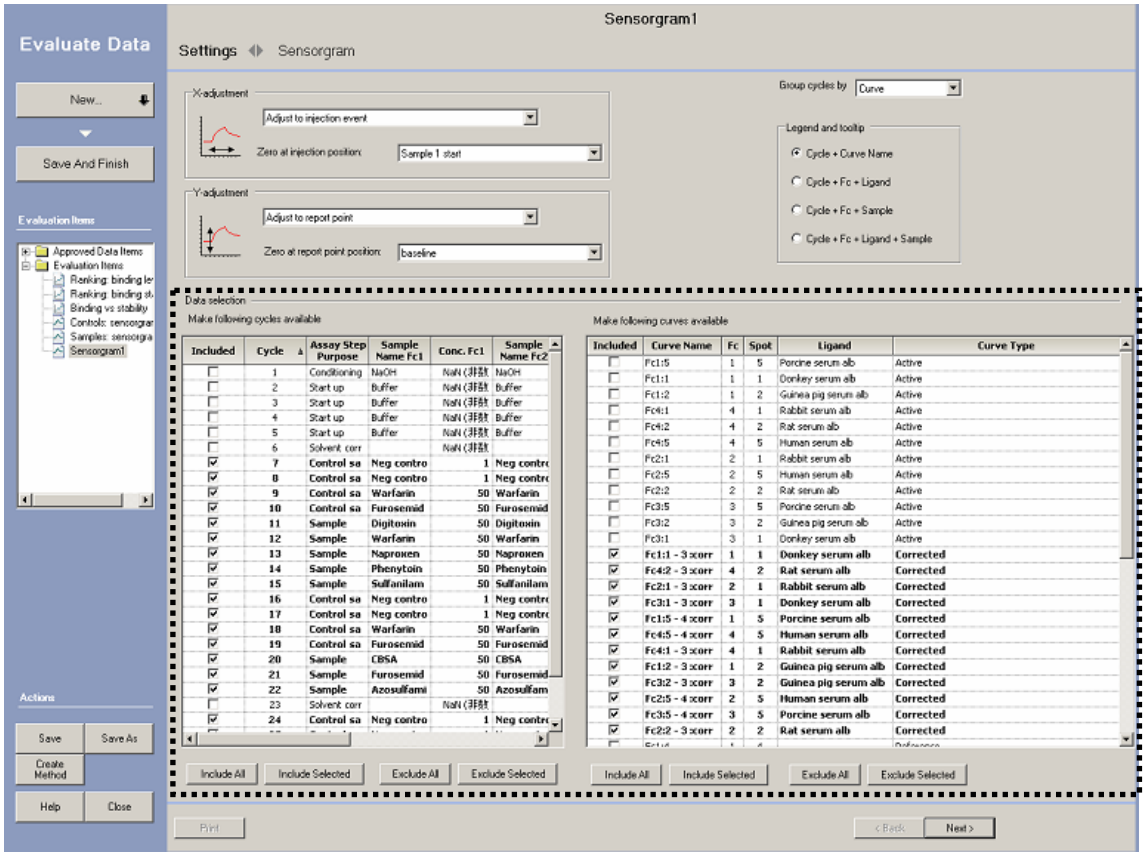
Legend and tooltip

凡例の書式を設定する。



↓

Data selection　：表示するセンサーグラムを選択する。



Make following cycles available

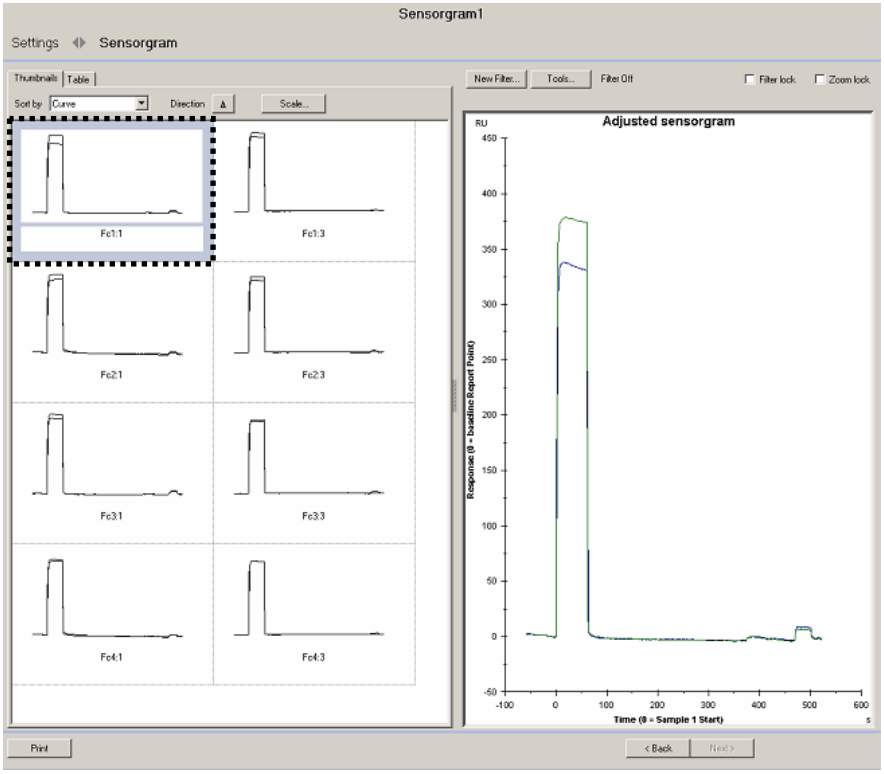
　表示する測定サイクルを選択する。

Make following curves available

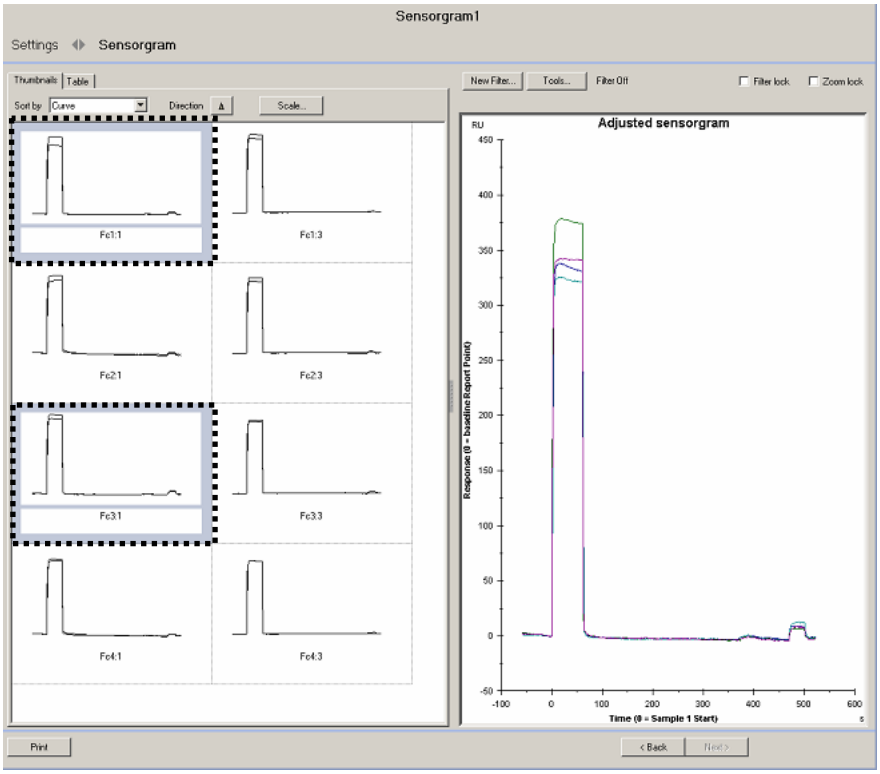
　表示するセンサーグラムを選択する。

↓

選択したセンサーグラムが表示される。



各センサーグラムをさらに重ね合わせる場合は、左画面で Ctrl キーを押しながら目的のセンサーグラムを左クリックする。



右画面に重ね合わせた結果が表示される。

9-2-2.　反応速度定数・解離定数

① アフィニティーとカイネティクス

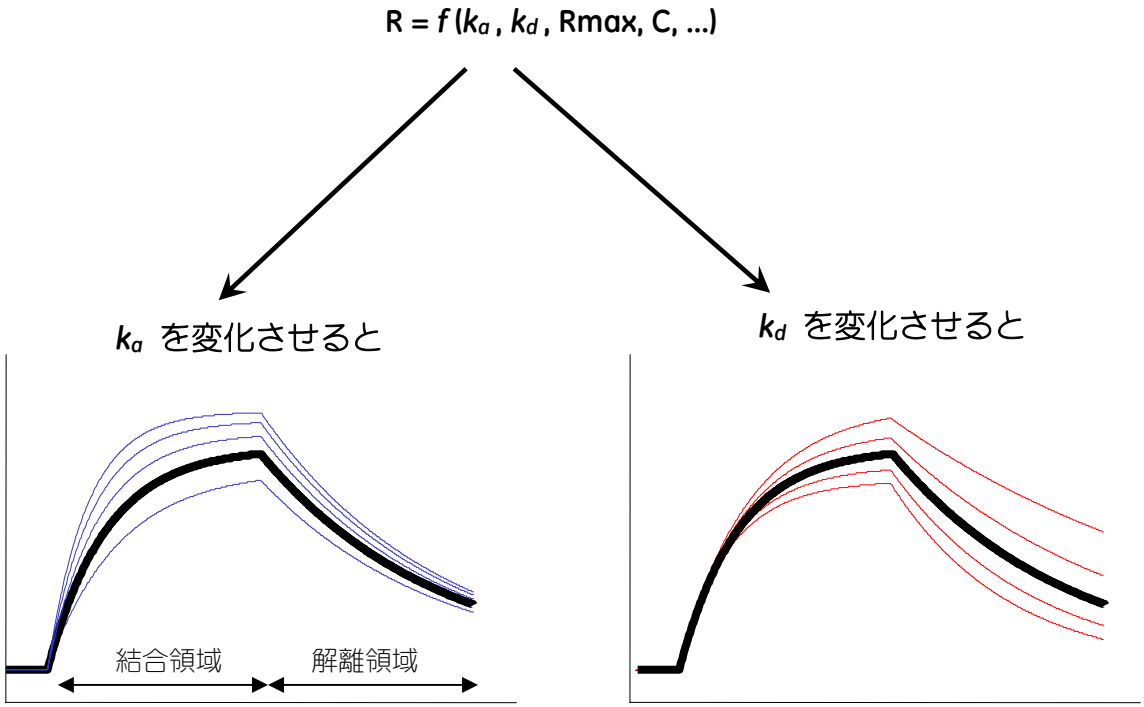
分子同士が相互作用するときには、両者にはアフィニティー（親和性）があると表現する。解離定数はアフィニティーの強さを表す尺度として一般的に使用され、K_D（単位 M）として記述される。解離定数（K_D）は、A+B⇔AB 反応の平衡状態において、K_D = ［A］［B］/［AB］と定義される。形成される複合体の割合が多いほど、つまりこの数値が小さいほどアフィニティーは高い。また、アフィニティーは、その分子間の結合と解離の速さからも算出できる。速い結合および遅い解離の相互作用ほどアフィニティーは高い。これら反応速度（カイネティクス）に関するパラメータは、結合速度定数（k_a、単位 $M^{-1}s^{-1}$）、解離速度定数（k_d、単位 s^{-1}）として表現される。

$$A + B \underset{k_d}{\overset{k_a}{\rightleftharpoons}} AB$$

$$K_D = k_d / k_a$$

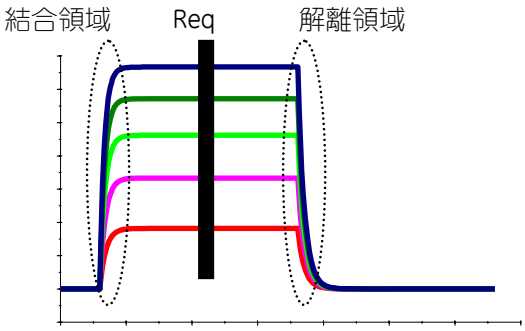
② 反応速度定数（k_a、k_d）、解離定数（K_D）の算出方法

カイネティクス解析は得られたセンサーグラムに反応モデル式（リガンドとアナライトが 1 分子同士で結合する 1:1 binding モデル）を使用してカーブフィッティングする非線形最小二乗法により定数を算出する手法である。

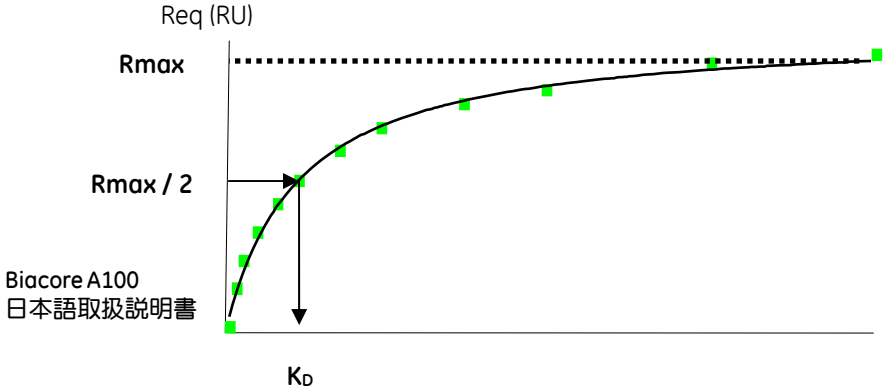


③ アフィニティーの低い相互作用の解析方法

アフィニティーの低い相互作用はきわめて速く平衡状態(Req)へと移行する。複合体の安定性が低いため解離が速く、センサーグラムの形状は箱型となる。よって結合領域および解離領域はきわめて短く、カーブフィッティングによる反応速度定数の算出は困難である。



このようなセンサーグラムはアナライト濃度（C）に対する平衡値（Req）のプロットから、解離定数（K_D）を算出する。



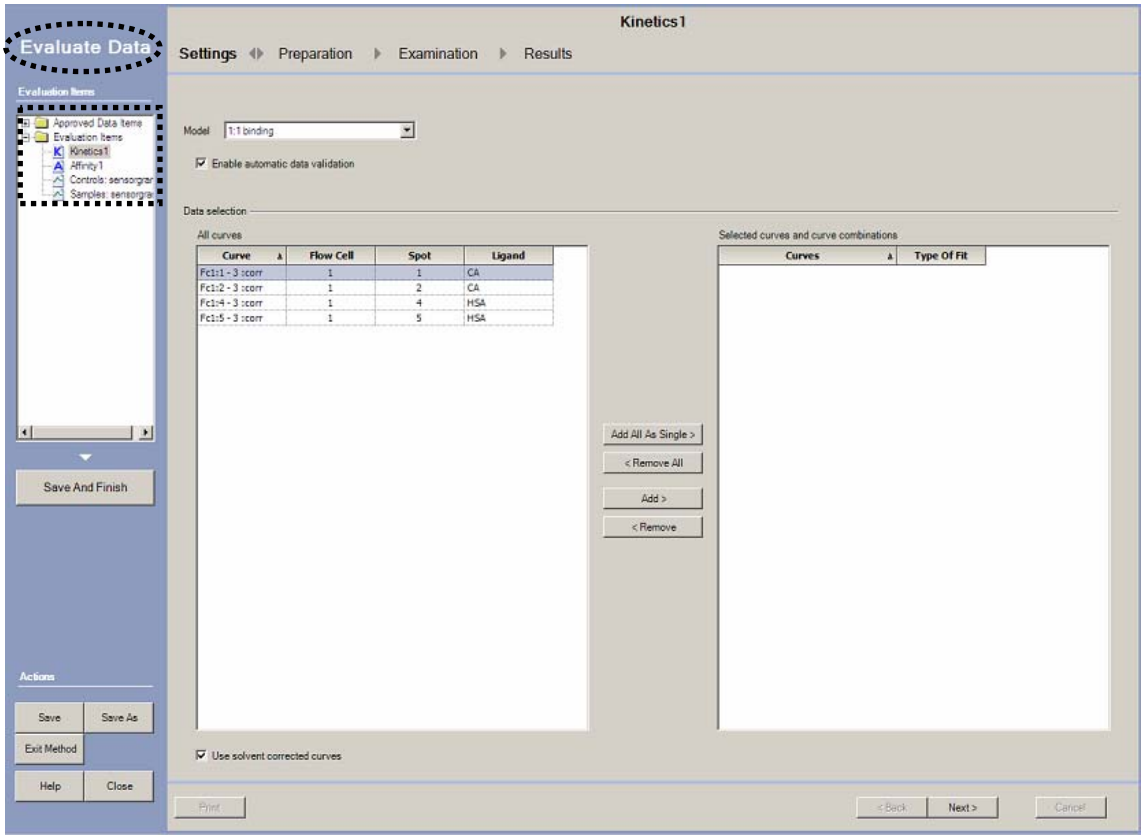
C (M)

④ 至適アナライト濃度
カイネティクス解析で良好な結果を得るためには、予想される解離定数(K_D)値の1/10～10 倍の濃度範囲で測定する。また 5 段階以上の濃度系列と濃度 0 について測定する。さらに 1 濃度については 2 回(n=2)測定する。
アフィニティーが低く、箱型のセンサーグラムになり、カイネティクス解析が困難な場合は 10 段階以上の濃度系列と濃度 0 について測定する。
濃度範囲は高濃度側まで幅広くとることを推奨する。

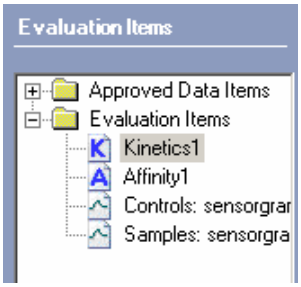
9-2-2-1.　反応速度定数・解離定数の算出

解析テンプレート：Kinetics and Affinity、Kinetics and Affinity with capture

＜反応速度定数の算出＞



ナビゲーションパネルに Evaluation Items フォルダができる。

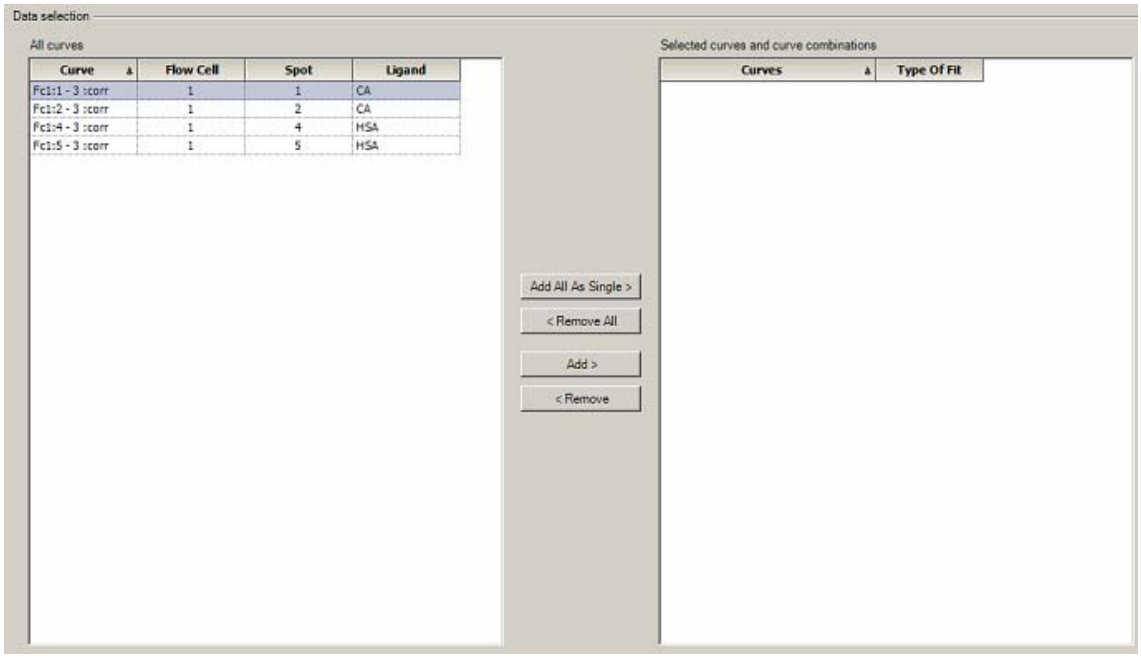


↓

Kinetics1 を選択する。

↓

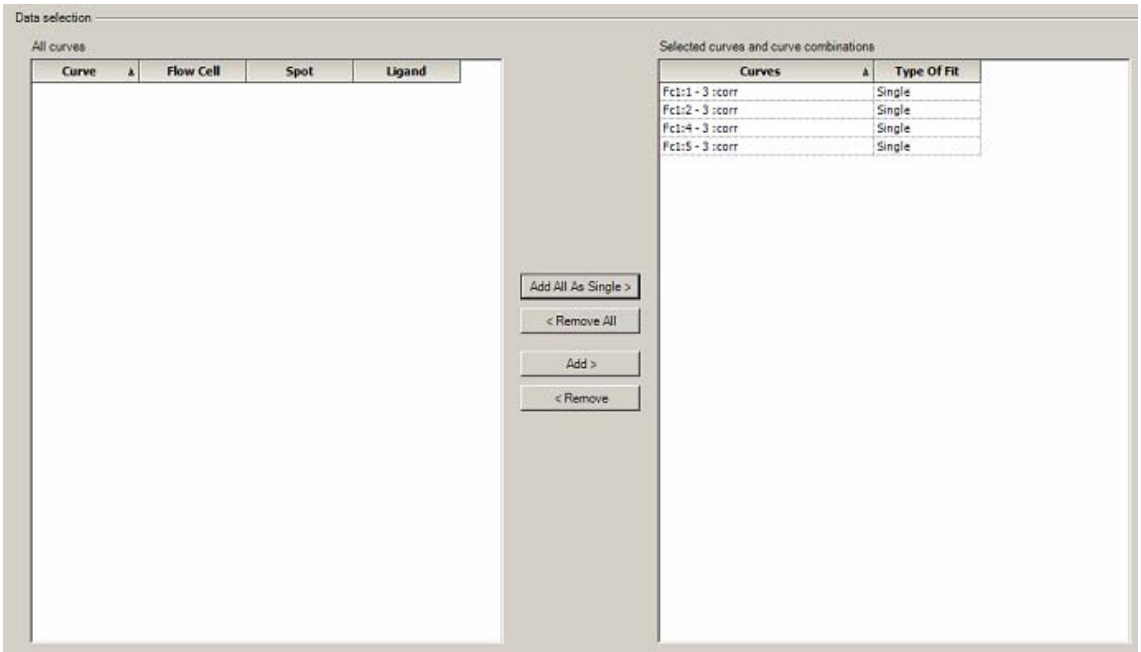
All curves に解析可能なセンサーグラムのリストが表示される。



すべて解析する場合には **Add All As Single >**、 一部を解析する場合は選択して **Add >**をクリックする。

↓

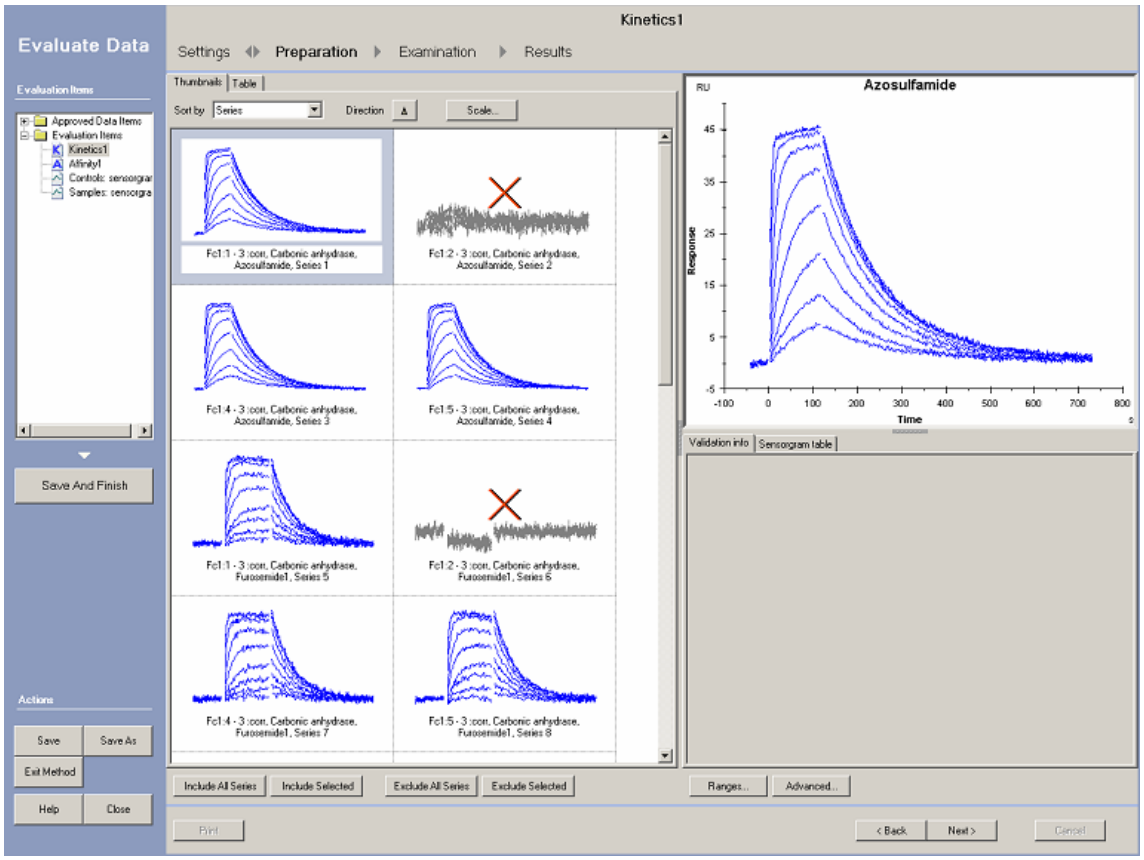
Selected curves and combinations リストに登録される。



画面右下の **Next >**をクリックする。

↓

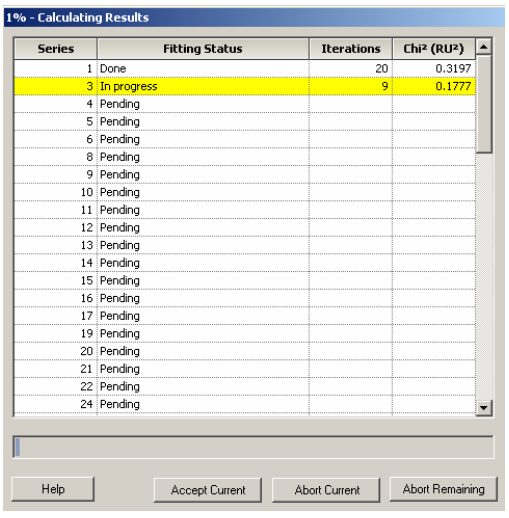
解析不能なセンサーグラムには×印が表示され、解析対象から除外される。



↓

Next >をクリックする。計算が開始される。

↓



黄色は解析中のセンサーグラム。終了すると白塗りになり Fitting status が”Done”

になる。計算に時間を要する場合に以下の機能を適応することができる。

Accept Current　：その時点までの計算結果を解析解とする。

Abort Current　：現行センサーグラムの計算を中止し、次のセンサーグラムの計算に移る。

Abort Remaining：残りすべての解析を中止する。

↓

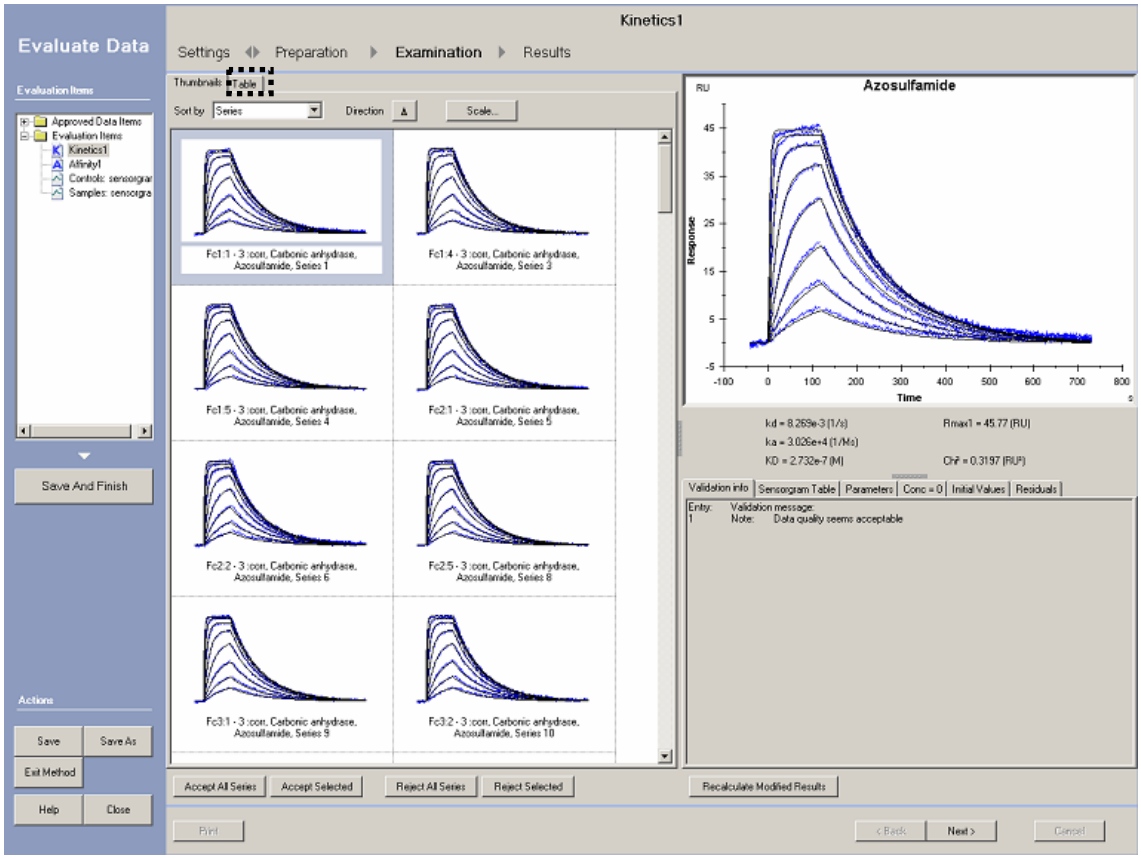
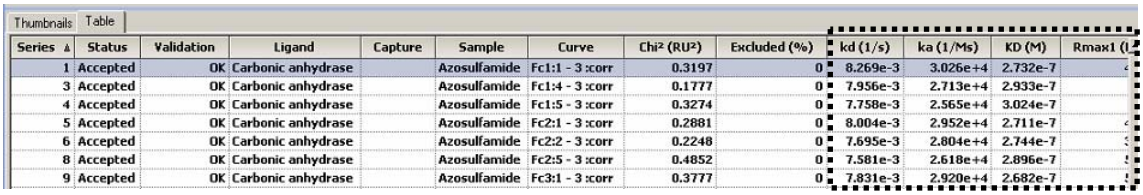


Table タブをクリックすると解析結果の一覧が表示される。



Series	Status	Validation	Ligand	Capture	Sample	Curve	Chi² (RU²)	Excluded (%)	kd (1/s)	ka (1/Ms)	KD (M)	Rmax1 (R
1	Accepted	OK	Carbonic anhydrase		Azosulfamide	Fc1:1 - 3 :corr	0.3197	0	8.269e-3	3.026e+4	2.732e-7	
3	Accepted	OK	Carbonic anhydrase		Azosulfamide	Fc1:4 - 3 :corr	0.1777	0	7.956e-3	2.713e+4	2.933e-7	
4	Accepted	OK	Carbonic anhydrase		Azosulfamide	Fc1:5 - 3 :corr	0.3274	0	7.758e-3	2.565e+4	3.024e-7	
5	Accepted	OK	Carbonic anhydrase		Azosulfamide	Fc2:1 - 3 :corr	0.2881	0	8.004e-3	2.952e+4	2.711e-7	
6	Accepted	OK	Carbonic anhydrase		Azosulfamide	Fc2:2 - 3 :corr	0.2248	0	7.695e-3	2.804e+4	2.744e-7	
8	Accepted	OK	Carbonic anhydrase		Azosulfamide	Fc2:5 - 3 :corr	0.4852	0	7.581e-3	2.618e+4	2.896e-7	
9	Accepted	OK	Carbonic anhydrase		Azosulfamide	Fc3:1 - 3 :corr	0.3777	0	7.831e-3	2.920e+4	2.682e-7	

算出パラメータ

kd (1/s)　：解離速度定数

ka (1/Ms)　：結合速度定数

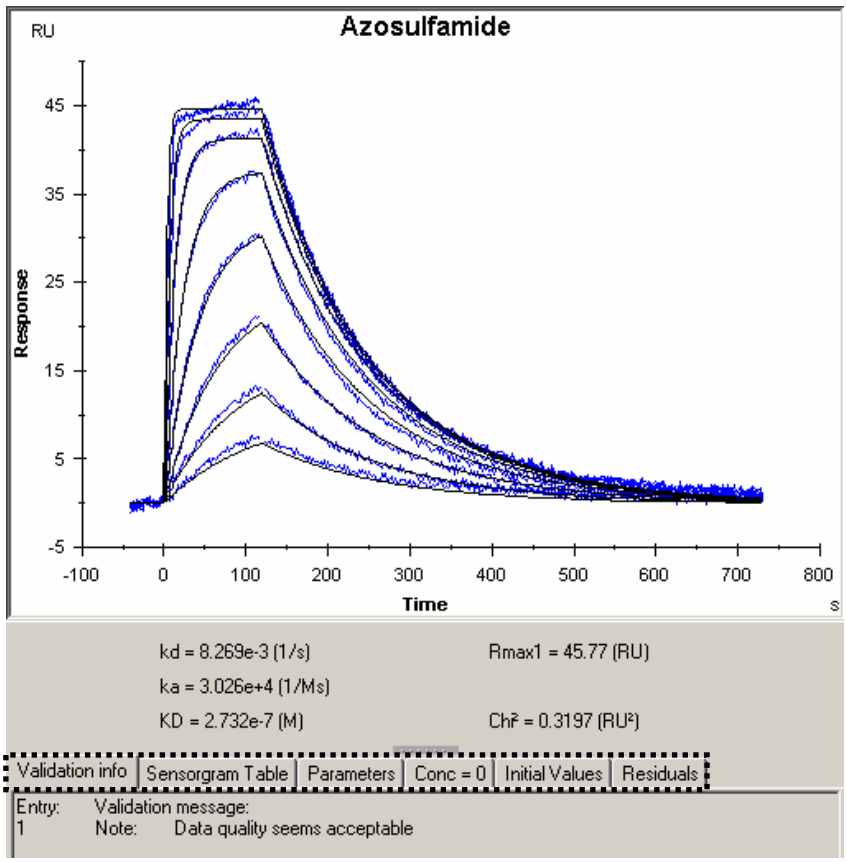
KD (M)　：解離定数

Rmax1　：アナライトの最大結合量

Chi²(RU²)　：カイ 2 乗

個々の解析結果を確認する場合には、センサーグラムの下にある 6 つのタブを

順次クリックする。



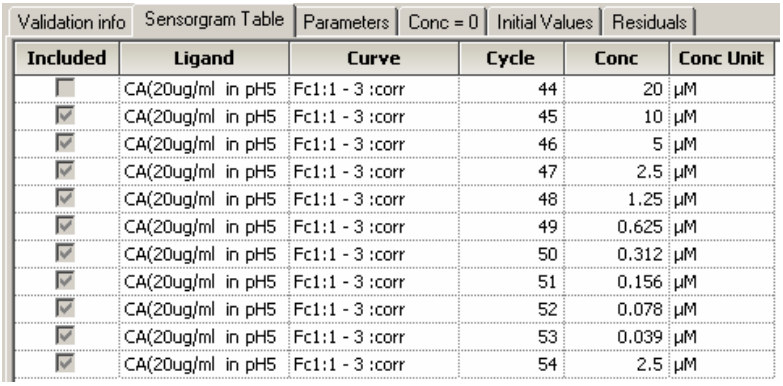
Validation info

解析のバリデーション結果

Sensorgram Table

解析するセンサーグラムを選択し、再解析する際に使用する。

Included で解析するセンサーグラムを選択し、画面下の **Recalculate Modified Results** をクリックすると再計算される。

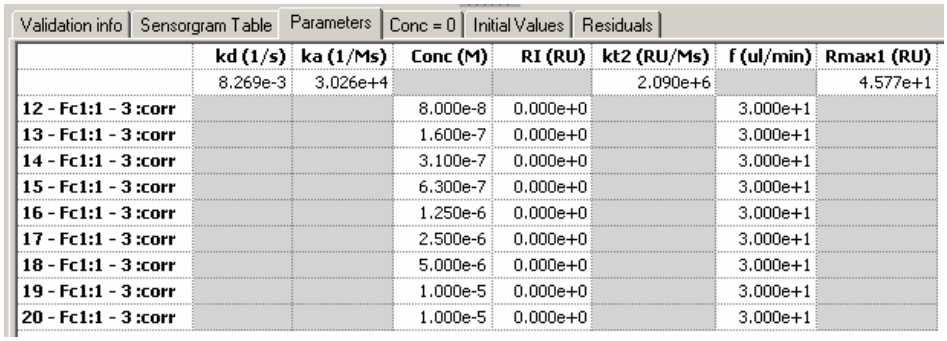


Included	Ligand	Curve	Cycle	Conc	Conc Unit
☐	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	44	20	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	45	10	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	46	5	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	47	2.5	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	48	1.25	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	49	0.625	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	50	0.312	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	51	0.156	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	52	0.078	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	53	0.039	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	54	2.5	µM

。

Parameters

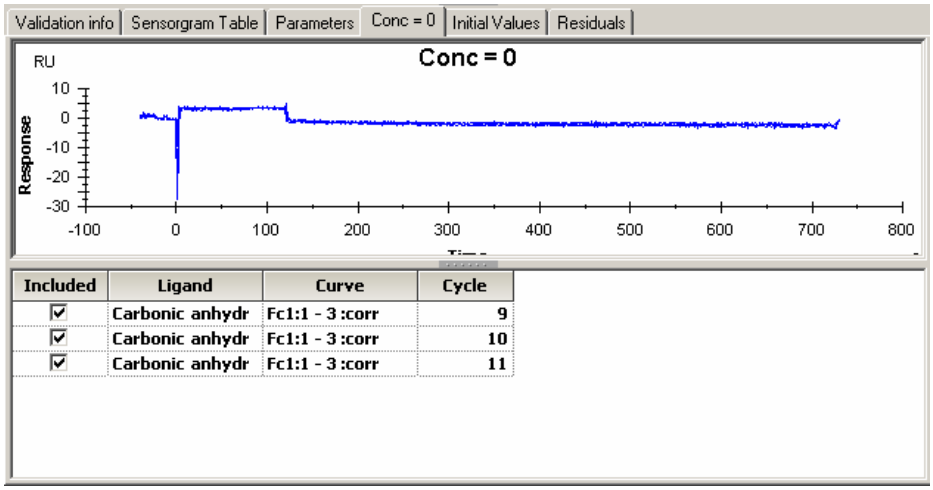
解析結果



	kd (1/s)	ka (1/Ms)	Conc (M)	RI (RU)	kt2 (RU/Ms)	f (ul/min)	Rmax1 (RU)
	8.269e-3	3.026e+4			2.090e+6		4.577e+1
12 - Fc1:1 - 3 :corr			8.000e-8	0.000e+0		3.000e+1	
13 - Fc1:1 - 3 :corr			1.600e-7	0.000e+0		3.000e+1	
14 - Fc1:1 - 3 :corr			3.100e-7	0.000e+0		3.000e+1	
15 - Fc1:1 - 3 :corr			6.300e-7	0.000e+0		3.000e+1	
16 - Fc1:1 - 3 :corr			1.250e-6	0.000e+0		3.000e+1	
17 - Fc1:1 - 3 :corr			2.500e-6	0.000e+0		3.000e+1	
18 - Fc1:1 - 3 :corr			5.000e-6	0.000e+0		3.000e+1	
19 - Fc1:1 - 3 :corr			1.000e-5	0.000e+0		3.000e+1	
20 - Fc1:1 - 3 :corr			1.000e-5	0.000e+0		3.000e+1	

Conc=0

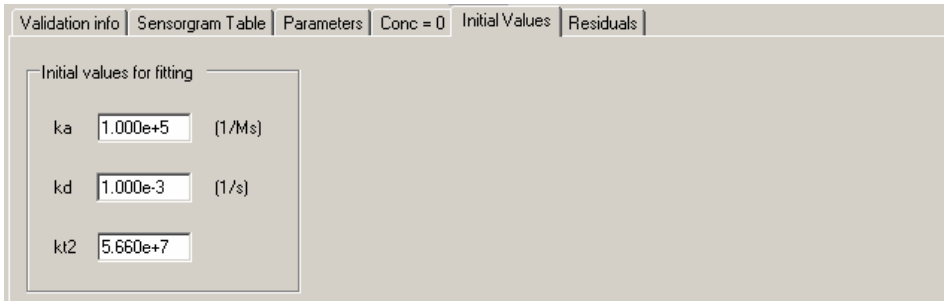
0 濃度のセンサーグラム。各濃度のセンサーグラムから自動的に差し引かれる。
複数測定した場合にはその平均値を差し引く。



Included	Ligand	Curve	Cycle
☑	Carbonic anhydr	Fc1:1 - 3 :corr	9
☑	Carbonic anhydr	Fc1:1 - 3 :corr	10
☑	Carbonic anhydr	Fc1:1 - 3 :corr	11

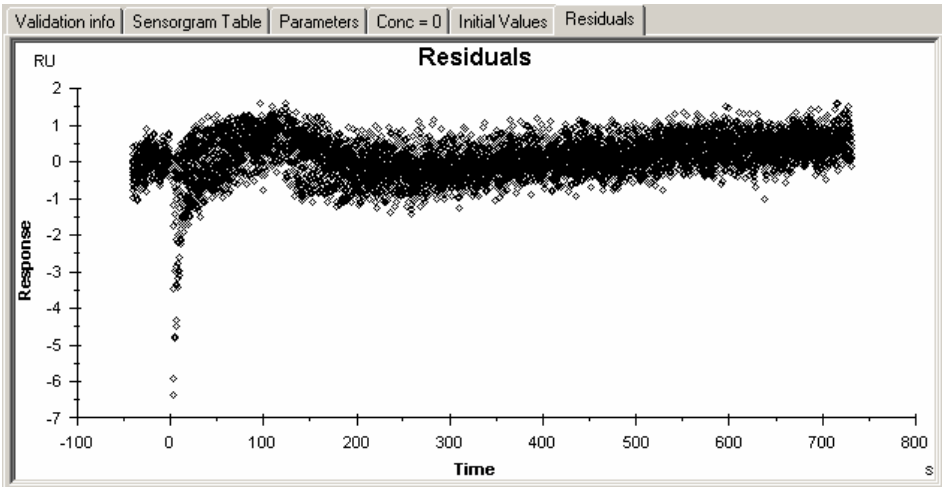
Initial Values

解析の初期値



Residuals(Kinetics 解析のみ)

測定データと解析値の差

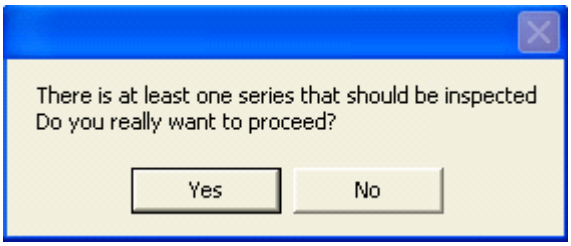


↓

Next >をクリックする。

↓

解析結果に 、 が表示された場合には下記ダイアログが表示される。



解析を終了する場合には **Yes** をクリックする。

↓

が表示され解析が終了する。

この段階で Kinetics 解析結果が固定される。

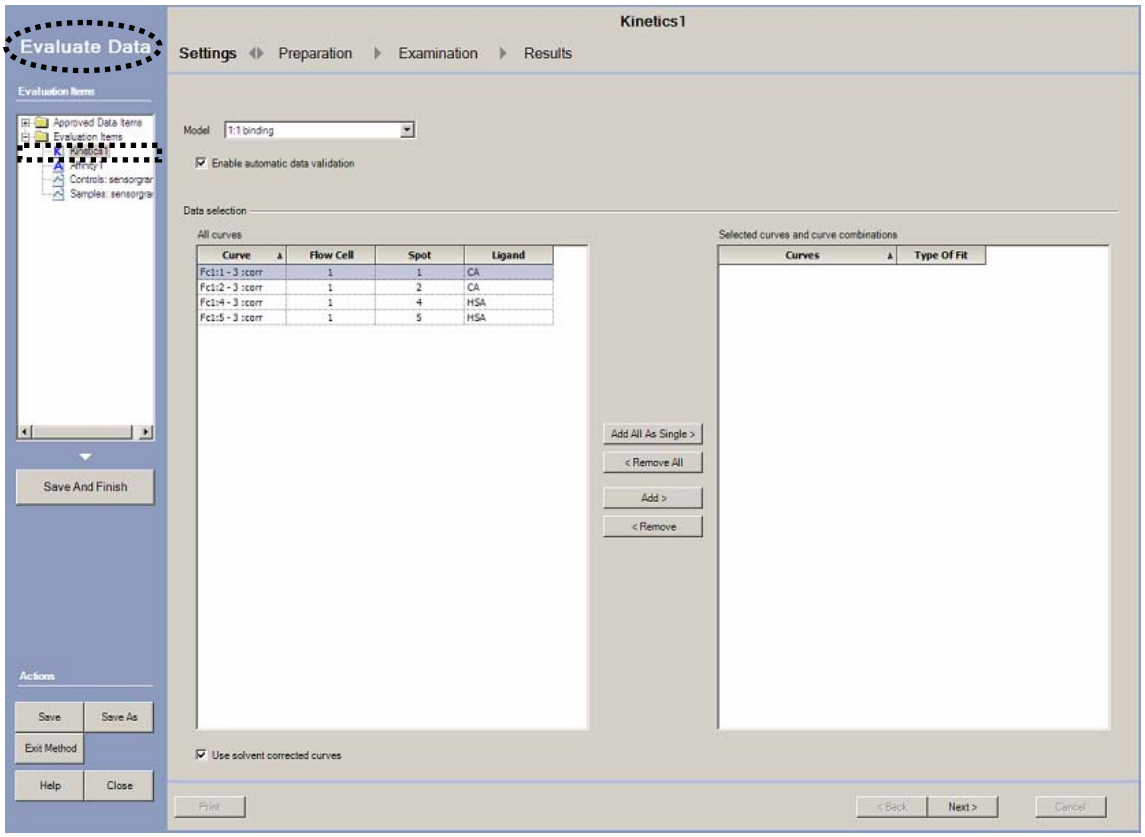
↓

解析結果を保存する場合は、ナビゲーションパネルの **Save** もしくは **Save As** をクリックし、データを保存する。

解析モードの変更、あるいは解析に用いるセンサーグラムを減らして再解析する場合には 214 ページの補足 19、216 ページの補足 20 を参照のこと。

＜解離定数の算出＞

Evaluate Data



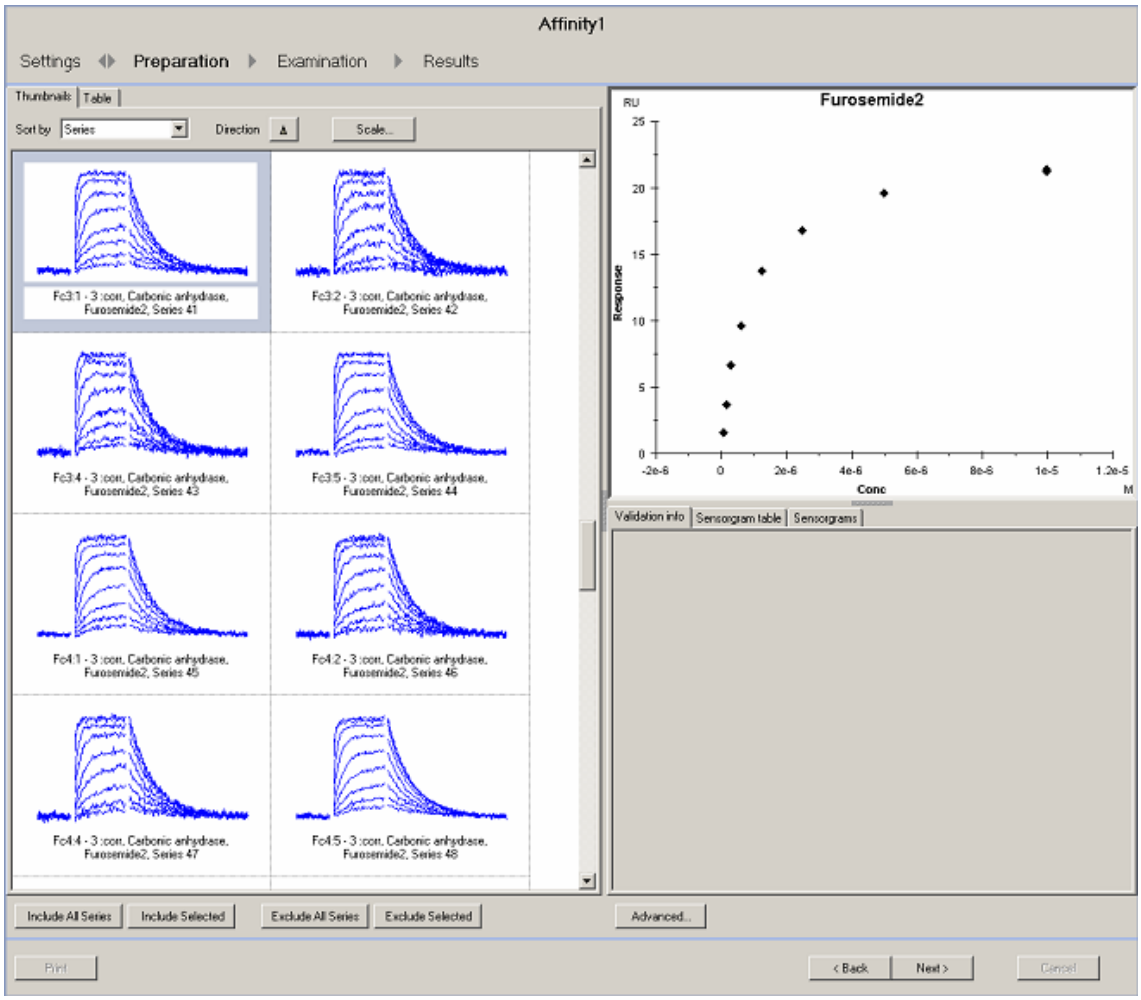
ナビゲーションパネルの Evaluation Items から **Affinity1** を選択する。

All curves から解析するデータを選択し Curves and combinations in affinity evaluation に登録する。

↓

画面右下の **Next >**をクリックする。

↓



↓

Next >をクリックする。

↓

アナライト濃度と平衡値 (Req)のプロットの解析結果が表示される。

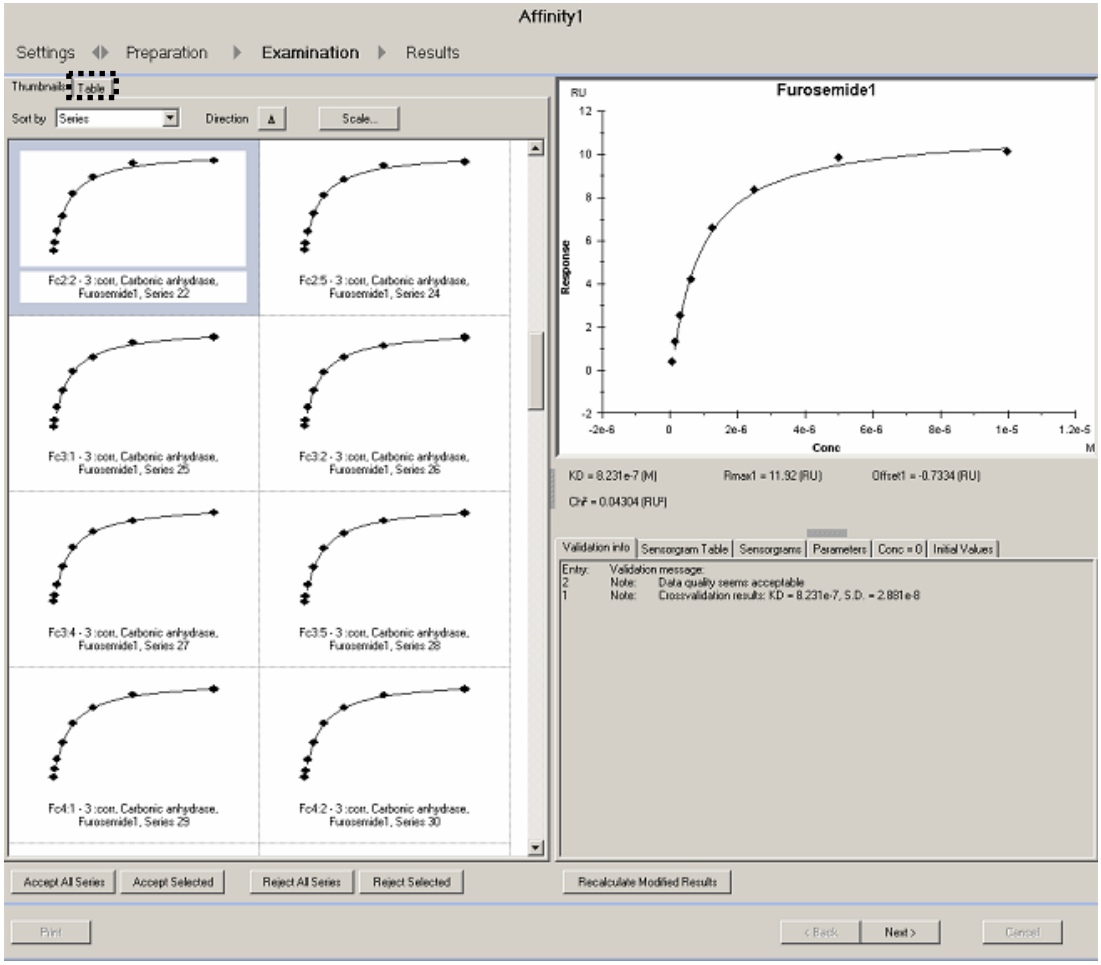


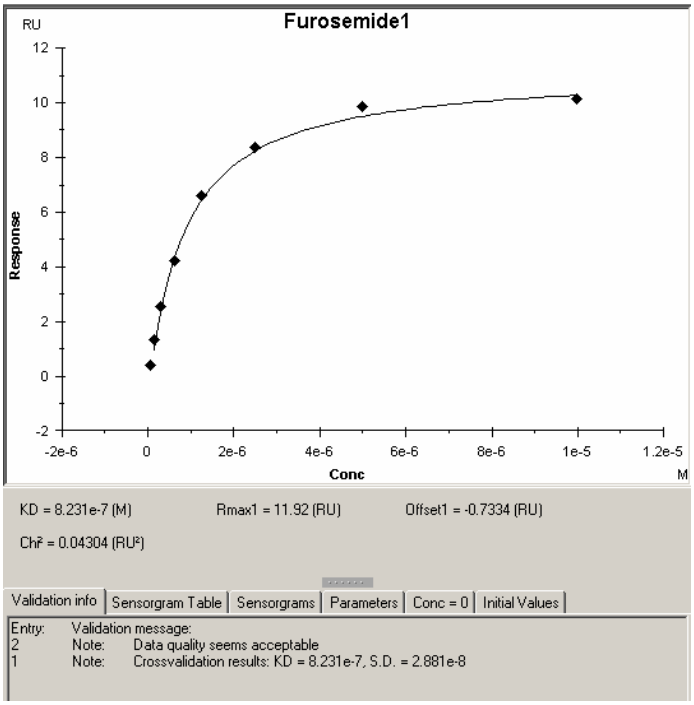
Table タブをクリックすると解析結果の一覧を確認することができる。

算出パラメータ

KD (M)：解離定数

Rmax1：アナライトの最大結合量

個々のアナライトについて解析結果を確認する場合には、プロットの下にある６つのタブを順次クリックする。



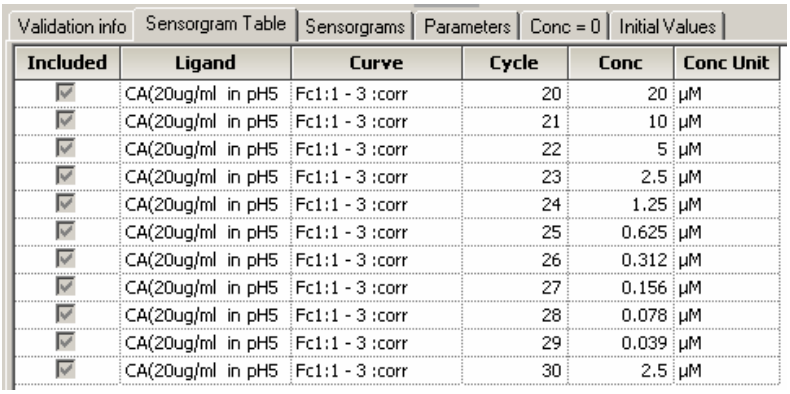
Validation info

解析のバリデーション結果

Sensorgram Table

解析するセンサーグラムを選択し再解析することができる。

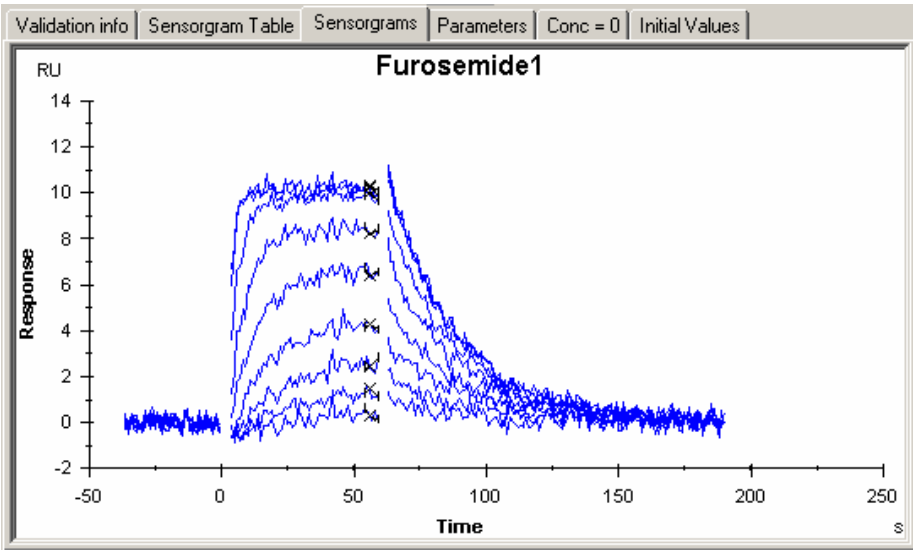
選択後画面下の **Recalculate Modified Results** をクリックすると再計算される。



Validation info | Sensorgram Table | Sensorgrams | Parameters | Conc = 0 | Initial Values

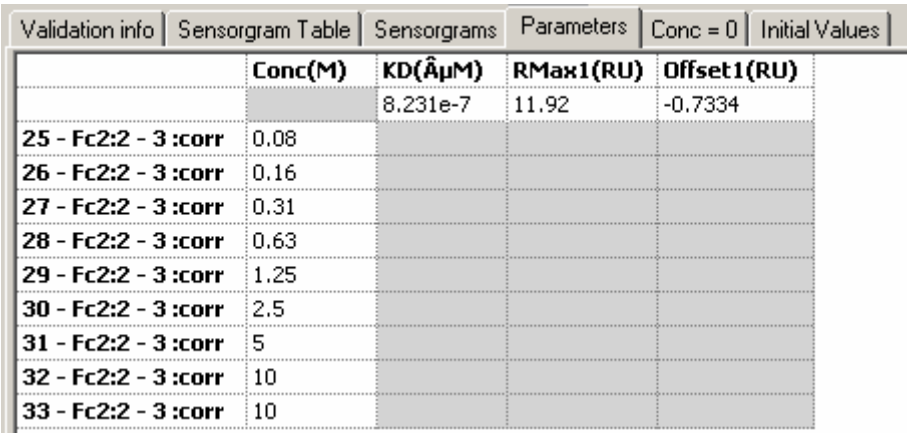
Included	Ligand	Curve	Cycle	Conc	Conc Unit
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	20	20	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	21	10	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	22	5	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	23	2.5	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	24	1.25	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	25	0.625	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	26	0.312	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	27	0.156	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	28	0.078	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	29	0.039	µM
☑	CA(20ug/ml in pH5	Fc1:1 - 3 :corr	30	2.5	µM

Sensorgrams



Parameters

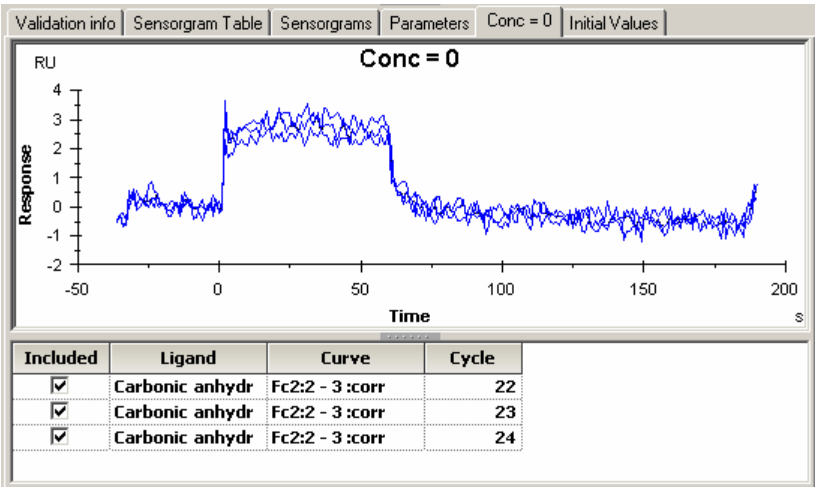
解析結果



	Conc(M)	KD(ÂµM)	RMax1(RU)	Offset1(RU)
		8.231e-7	11.92	-0.7334
25 - Fc2:2 - 3 :corr	0.08			
26 - Fc2:2 - 3 :corr	0.16			
27 - Fc2:2 - 3 :corr	0.31			
28 - Fc2:2 - 3 :corr	0.63			
29 - Fc2:2 - 3 :corr	1.25			
30 - Fc2:2 - 3 :corr	2.5			
31 - Fc2:2 - 3 :corr	5			
32 - Fc2:2 - 3 :corr	10			
33 - Fc2:2 - 3 :corr	10			

Conc=0

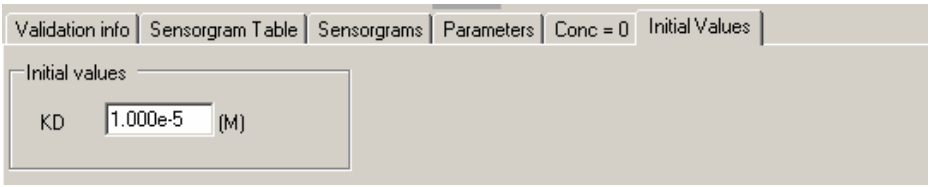
0 濃度のセンサーグラム



Included	Ligand	Curve	Cycle
☑	Carbonic anhydr	Fc2:2 - 3 :corr	22
☑	Carbonic anhydr	Fc2:2 - 3 :corr	23
☑	Carbonic anhydr	Fc2:2 - 3 :corr	24

Initial Values

解析の初期値

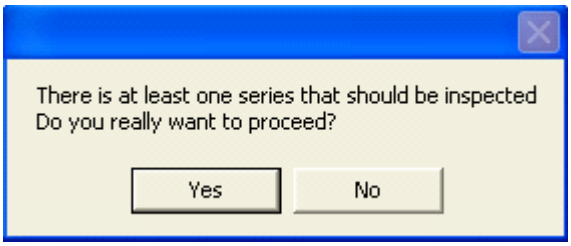


↓

Next >をクリックする。

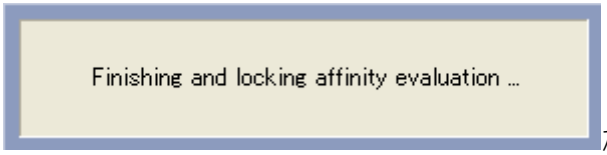
↓

解析結果に 、 が表示された場合には下記ダイアログが表示される。



解析を終了する場合には **Yes** をクリックする。

↓



が表示され解析が終了する。

この段階で Affinity 解析結果が固定される。

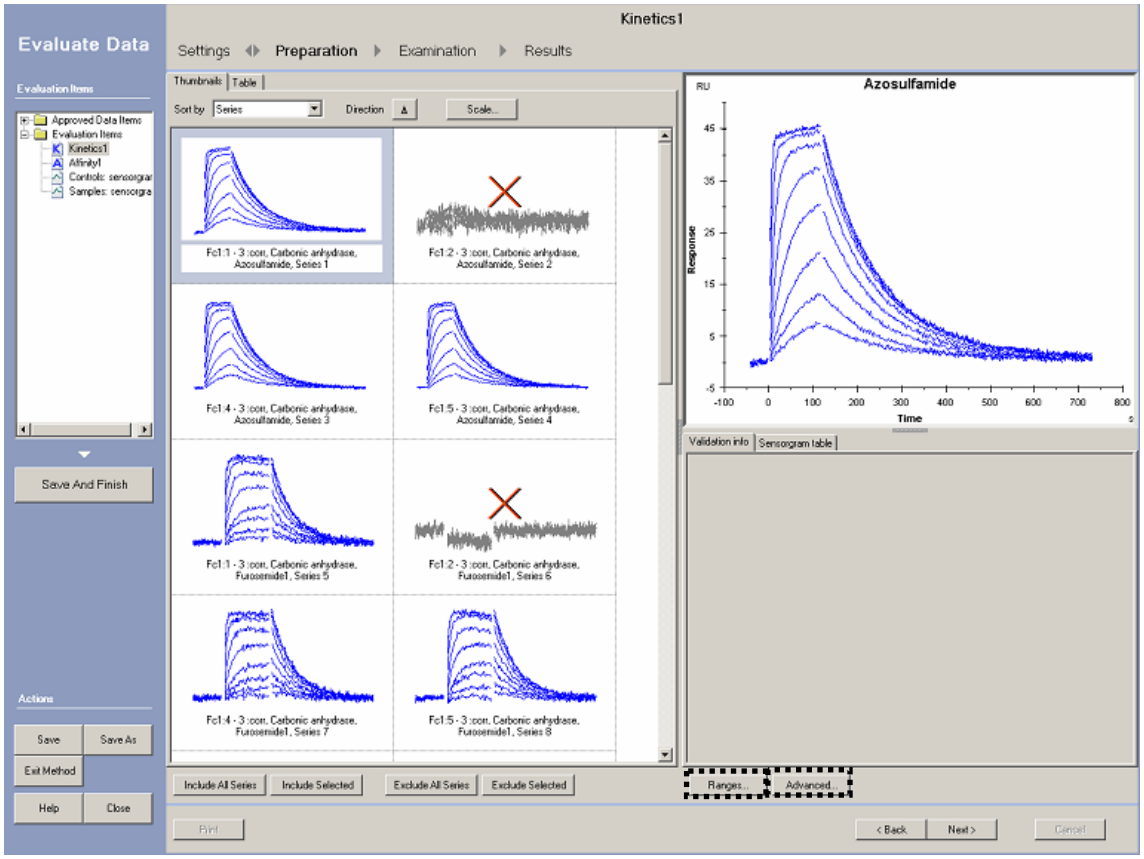
↓

解析結果を保存する場合は、ナビゲーションパネルの **Save** もしくは **Save As** をクリックし、データを保存する。

Kinetics 解析結果と Affinity 解析結果を両方固定した場合に、**Save And Finish** をクリックすると、全解析結果が固定される。

解析結果の保存形式については 221 ページの補足 22 を参照のこと。

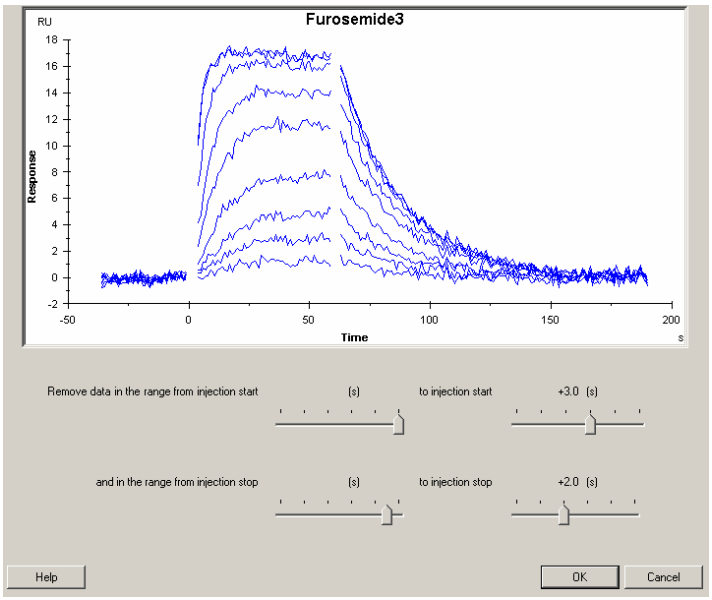
補足 19　解析モードの変更



Ranges...

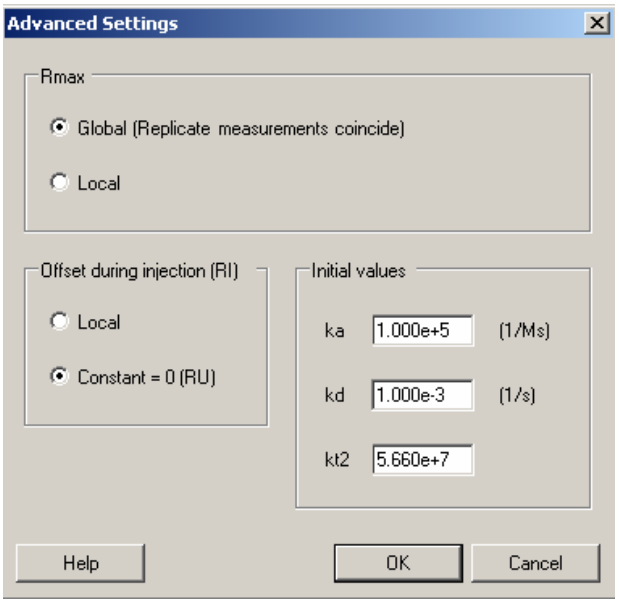
解析データ範囲の設定

インジェクション開始・終了直前直後のデータポイントは自動的に削除されている。4 つのスライダーを動かすことで削除する範囲を変更することができる。



Advanced...

解析パラメータの設定変更



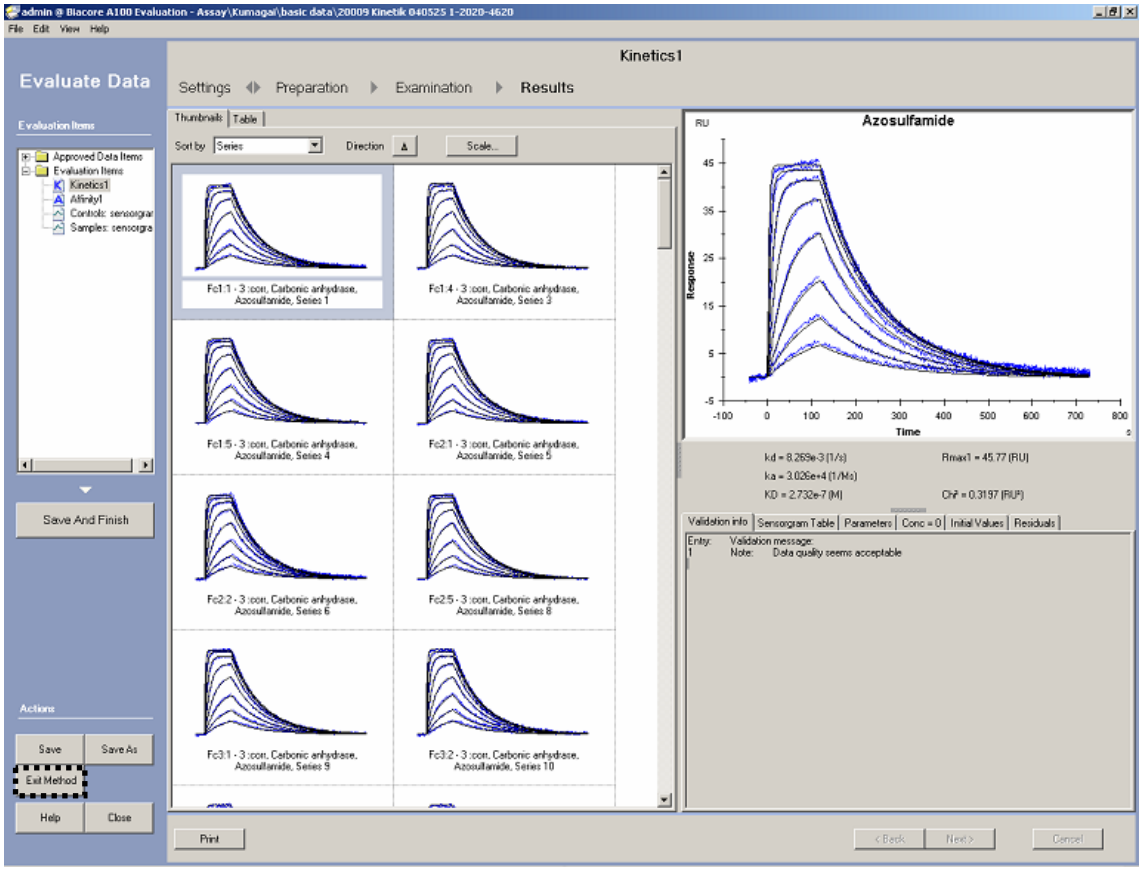
Rmax　：デフォルトは Global。経時的にリガンドが失活している場合や再生不十分であった場合、キャプチャー法で測定した場合には Local に設定する。

Offset during injection (RI)　：デフォルトは Constant = 0(RU)。センサーグラムにバルクレスポンスが含まれている場合には Local に変更する。

Initial values　：計算開始時の初期値。

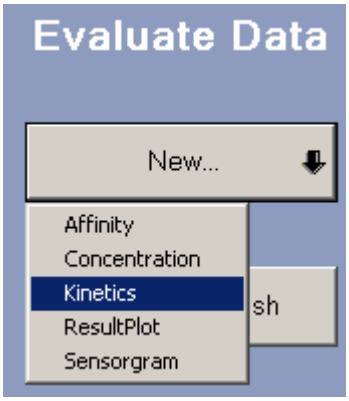
補足 20　再解析

解析するセンサーグラムの再選択、解析モードの変更等で同一データを再解析することができる。



ナビゲーションパネルの **Exit Method** をクリックする。

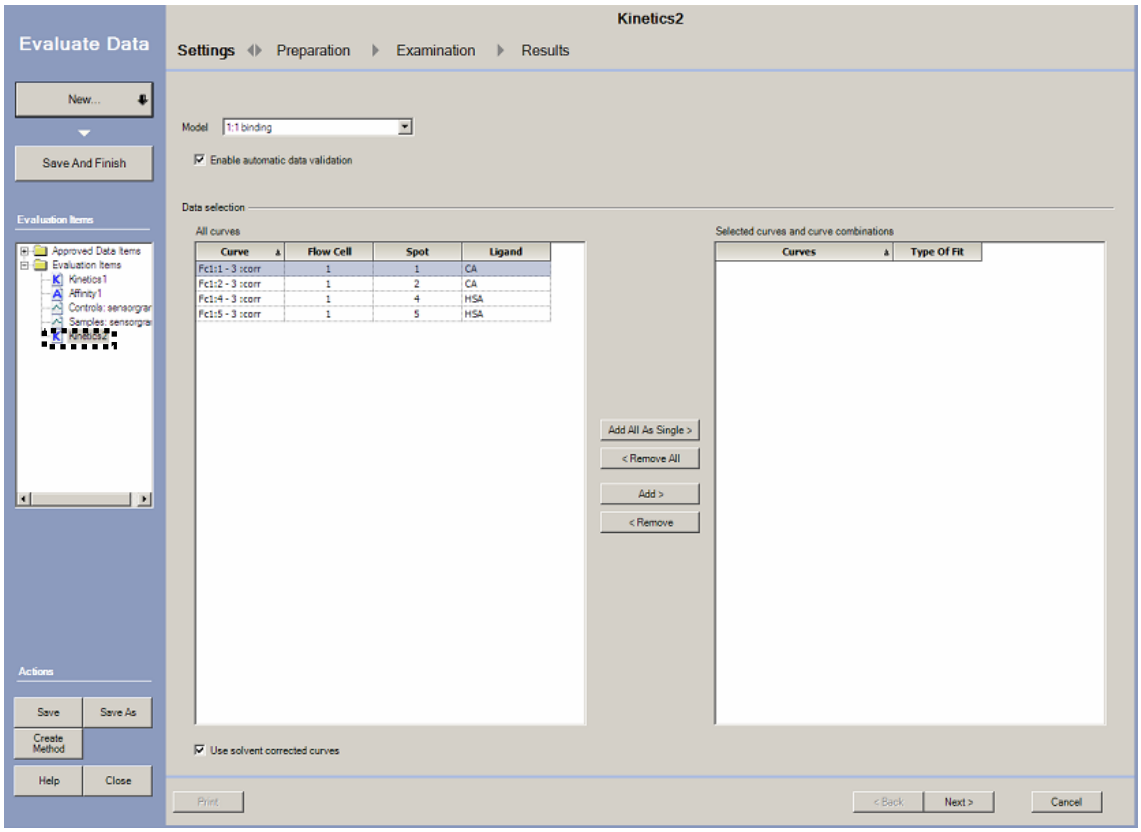
↓



ナビゲーションパネルの **New...**↓をクリックし **Kinetics** もしくは **Affinity** を選択する。

↓

ナビゲーションパネルの Evaluation Items ウィンドウ内に Kinetics2 もしくは Affinity2 が追加される。必要に応じて表示名を変更する。



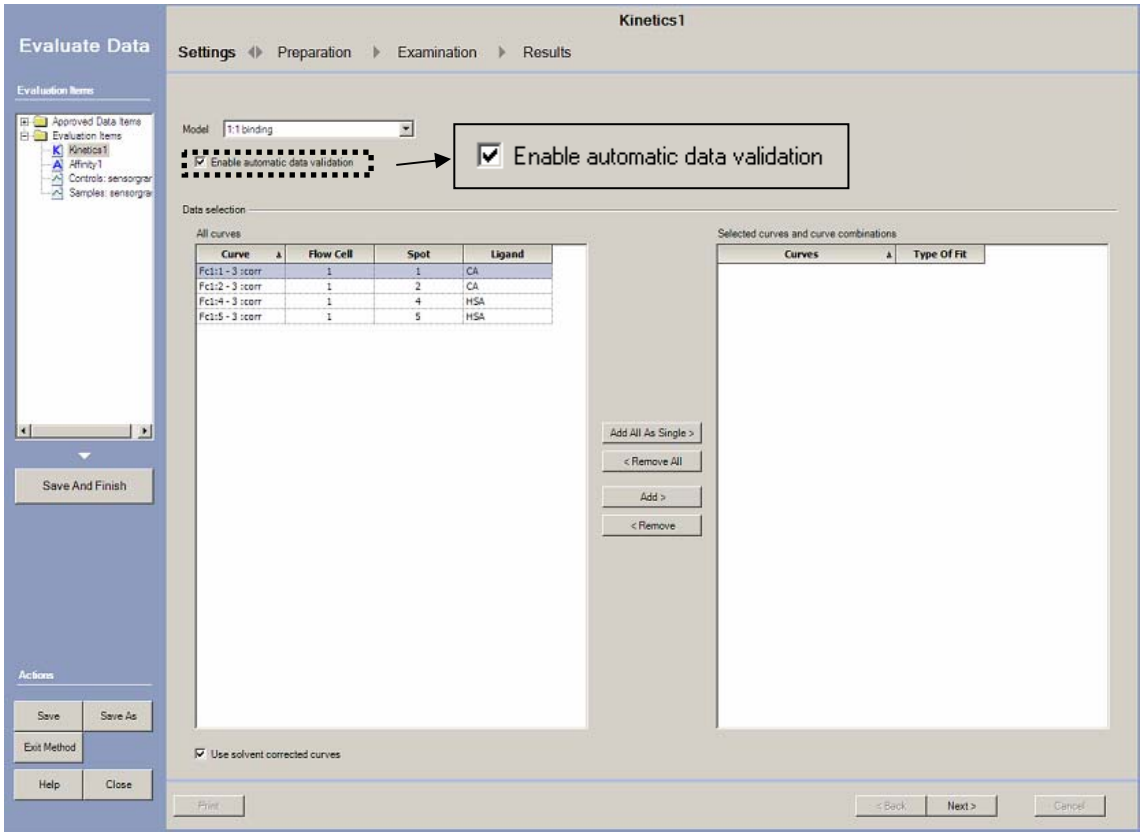
解析するセンサーグラムを選択し解析を進める。

補足 21　解析結果の自動評価機能

解析結果の評価をソフトウェアが行う機能。

解析スタート時の **Settings** ウィンドウ内の **Enable automatic data validation** で設定する。

デフォルトはチェックが入っている。



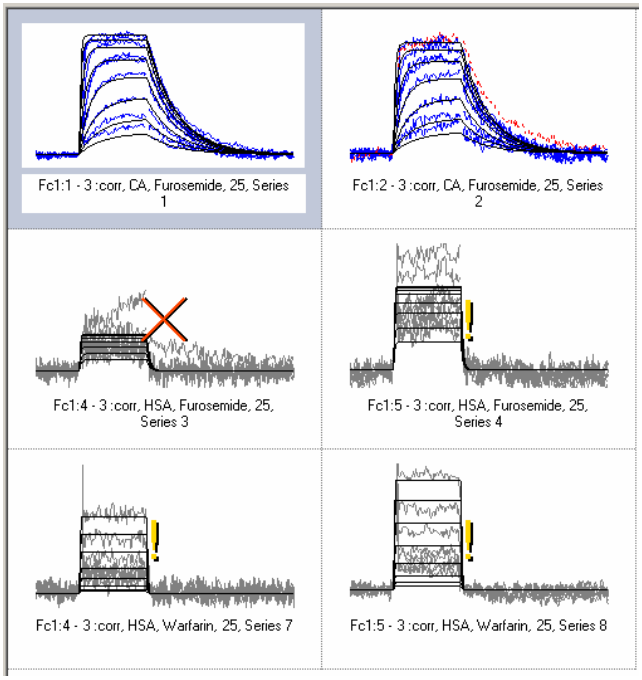
評価結果がセンサーグラム上に表示される。

無印：きわめて良好

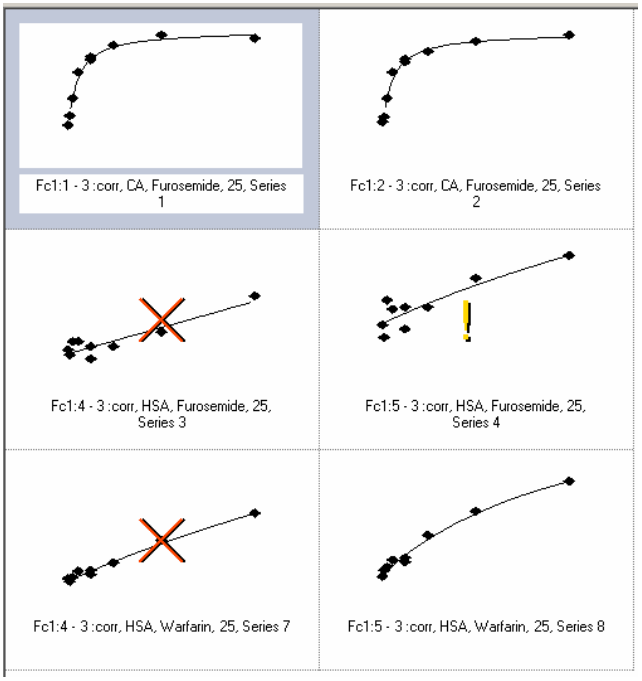
：結果の扱いに注意。**Validation info** のコメントを確認する。

：定数化不可

kinetics 解析


Fc1:1 - 3 :corr, CA, Furosemide, 25, Series 1
Fc1:2 - 3 :corr, CA, Furosemide, 25, Series 2
Fc1:4 - 3 :corr, HSA, Furosemide, 25, Series 3
Fc1:5 - 3 :corr, HSA, Furosemide, 25, Series 4
Fc1:4 - 3 :corr, HSA, Warfarin, 25, Series 7
Fc1:5 - 3 :corr, HSA, Warfarin, 25, Series 8

Affinity 解析


Fc1:1 - 3 :corr, CA, Furosemide, 25, Series 1
Fc1:2 - 3 :corr, CA, Furosemide, 25, Series 2
Fc1:4 - 3 :corr, HSA, Furosemide, 25, Series 3
Fc1:5 - 3 :corr, HSA, Furosemide, 25, Series 4
Fc1:4 - 3 :corr, HSA, Warfarin, 25, Series 7
Fc1:5 - 3 :corr, HSA, Warfarin, 25, Series 8

以下の場合に が表示され、定数化不能になる。

Kinetics

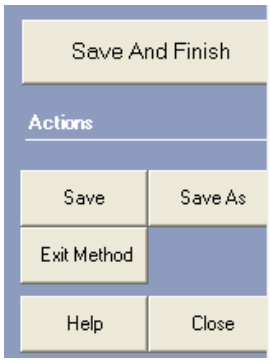
・ アナライト添加中のセンサーグラムの傾きがマイナス、解離の傾きがプラス
・ S/N 比が小さい。
・ 算出された反応速度定数のレンジオーバー。
　レンジ：結合速度定数（k_a）：10^3～3×10^8
　　解離速度定数（k_d）：10^{-5}～1
・ センサーグラム内に大きな乱れがある。

Affinity

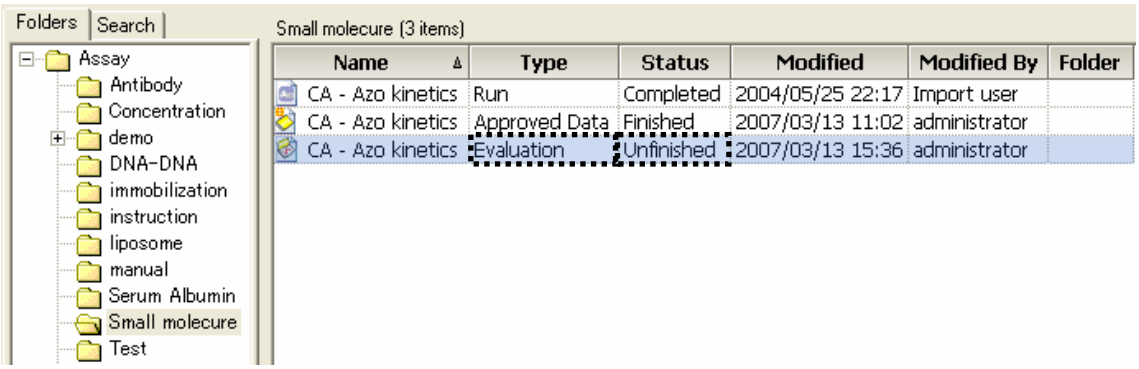
・ アナライト添加中のセンサーグラムの傾きがマイナス。解離の傾きがプラス
・ S/N 比が小さい。
・ データ数が 4 ポイント未満。
・ センサーグラムが平衡に達していない。
・ 測定濃度範囲が狭い（0 濃度を除く最低濃度と最高濃度で 10 倍以上必要）
・ 算出された Rmax が最大レスポンスよりもはるかに大きい。
・ オフセット（0 濃度の Req）が大きい。

補足 22　解析データの保存と保存形式

解析データの保存はナビゲーションパネルから実施する。

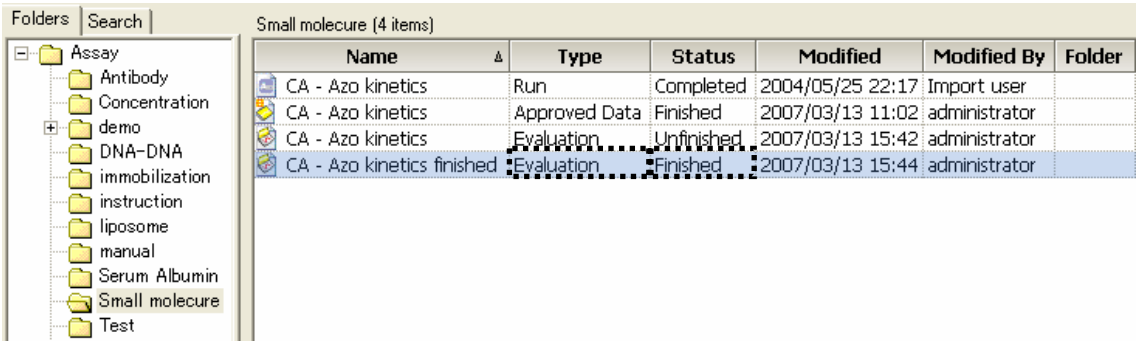


Save、Save As：解析途中のデータを保存する場合に選択する。



保存したデータは Type が”Evaluation”に、Status が”Unfinished”になる。
再解析する場合にはファイルを選択し、ダブルクリックする。

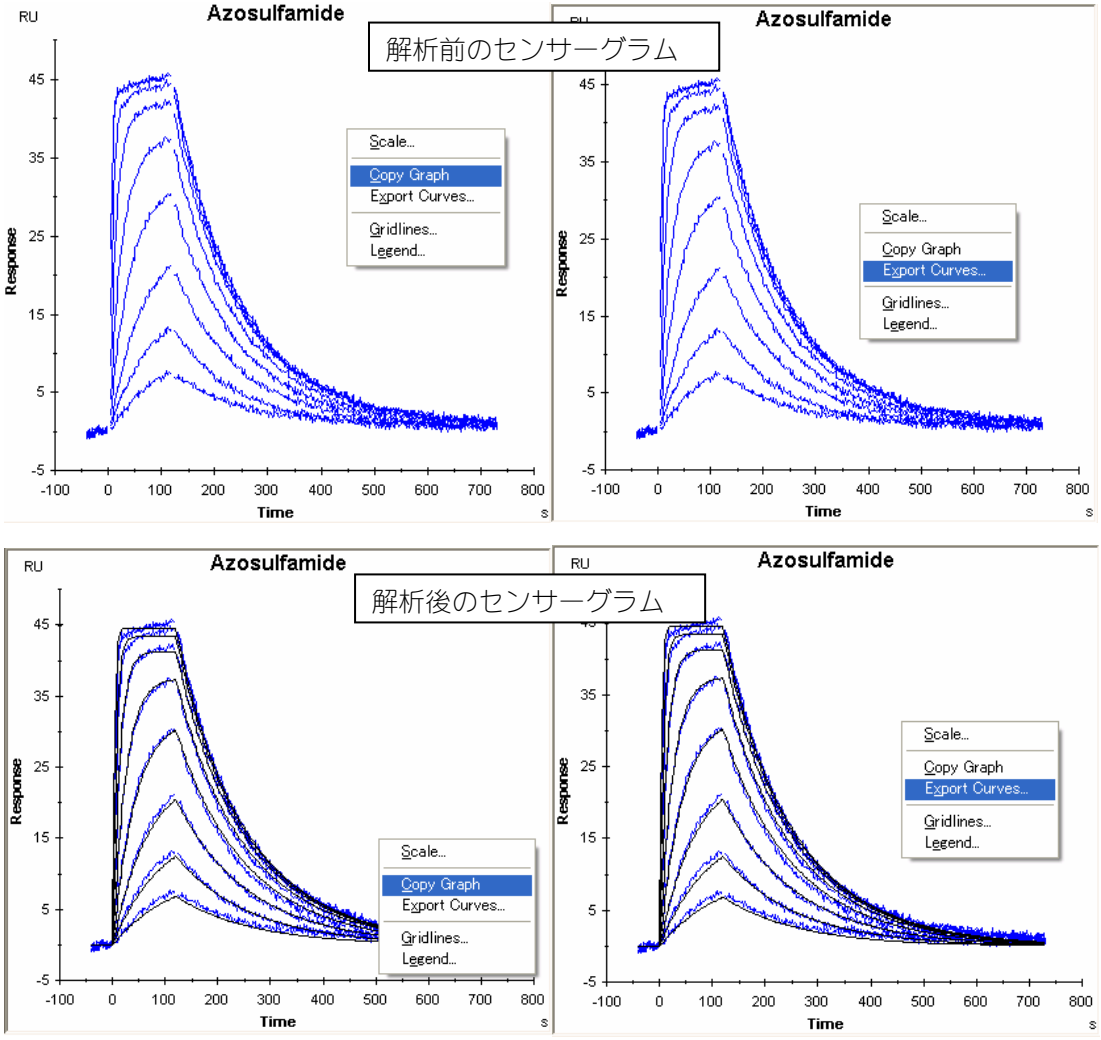
Save And Finish：解析結果を固定する場合に選択する。保存したデータを再解析することはできない。
（Kinetics and Affinity の解析テンプレートを使用した場合には、Kinetics 解析と Affinity 解析の結果をそれぞれ固定する必要がある。）



保存したデータは Type が”Evaluation”に、Status が”Finished”になる。

補足 23　センサーグラムの取り込みとテキストデータでの保存

センサーグラム上でマウスの右ボタンをクリックすると作業コマンドが表示される。



Copy Graph

センサーグラムを画像としてコピーする。続いて Biacore 付属のパソコンにインストールされている Word Pad、Paint などに貼り付け保存する。
保存したファイルは画像として別のパソコンに移動させることができる。

Export Curves...

センサーグラムをすべて数値化してテキストデータ（拡張子：txt）として保存する。保存したファイルは、他のパソコンの Microsoft Excel 等のソフトウェアで開くことができる。

10. 付属英語マニュアルの紹介

- **Biacore A100 Instrument Handbook**
  ハードウェア、メンテナンス、装置仕様の説明
- **Biacore A100 Software Handbook**
  Control software、Evaluation software の説明
- **Biacore A100 Methodology Handbook**
  測定目的別のメソッド作成方法と解析方法の説明
- **Sensor Surface Handbook**
  センサーチップへのリガンド固定化方法の説明

安全上のご注意

必ずお守りください

このしおりには、弊社機器に関する一般的な注意事項を記載しています。取扱いの詳細は必ず製品添付の使用説明書をご覧ください。

誤った取扱いをした場合に生じる危険や損害の程度を、次の区分で説明しています。

警告 誤った取扱いをした場合に、死亡や重傷を負う可能性があるもの。

注意 誤った取扱いをした場合に、傷害または物的損害が発生する可能性があるもの。

図記号の意味は次の通りです。

禁 止 ⃠は、してはいけない「禁止」を示します。

❗は、必ず実行していただく「強制」を示します。

警告

禁 止

電源プラグの抜き差しにより、運転を停止しない

火災・感電の原因になります。

禁 止

電源コードを途中で接続しない、タコ足配線をしない

火災・感電・故障の原因になります。

禁 止

電源コード・電源プラグを傷つけない

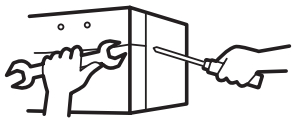
●加工しない ●束ねない ●ねじらない
●折らない ●物をのせない ●加熱しない
●無理に曲げない

破損して火災・感電の原因になります。

禁 止

修理・分解・改造はしない

火災・感電の原因になります。



根元まで差込む

電源プラグのほこりを取り除き、刃の根元まで確実に差込む

接続が不十分だと、隙間にほこりが付着して火災・感電の原因になります。

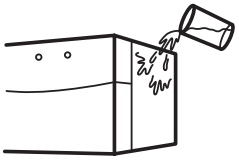
指定の規格

取扱説明書に指定された規格のコンセントを使用する

指定された規格以外で使用すると火災・感電の原因になります。

禁 止

本体を水につけたり、水をかけたりしない



ショート・感電の原因になります。

禁 止

電源コードや電源プラグが傷んだり、コンセントの差し込みがゆるいときは使わない

感電・ショート・発火の原因になります。

禁 止

使用時や使用直後（運転停止後約60分間）は、操作に関係のない部位には触れない

高温部に触れ、やけどの原因になります。

プラグを抜く

異常時は、運転を停止して電源プラグを抜く

異常のまま運転を続けると火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグ以外のコード・プラグを使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

禁 止

同梱の電源コード・電源プラグを他の電気機器に使用しない

故障・火災・感電の原因になります。

⚠ 注意

禁 止

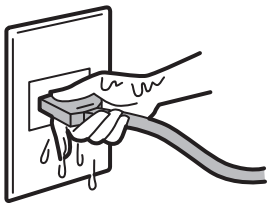
設置時は、次のような場所には置かない

●不安定な場所　●湿気やほこりの多い場所
●油煙や湯気が当たる場所
●直射日光の当たる場所　●風雨のあたる場所
●熱器具の近く　●高温になる場所
●吸・排気口をふさぐような場所

このような場所に置くと、ショートや発熱、電源コードの被膜が溶けるなどして、火災や感電、故障、変形の原因になることがあります。

禁 止

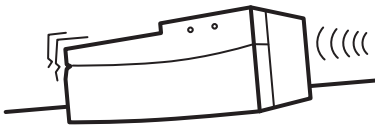
ぬれた手で電源プラグを抜き差しをしない



感電の原因になります。

水平

水平で丈夫な場所に設置する



プラグを持つ

電源プラグを持ってまっすぐ引き抜く

ななめに引き抜いたり、コードを持って抜くと、プラグの刃や芯線が破損してショート・感電・発火の原因になります。

⚠ 低温室で使用する場合の注意

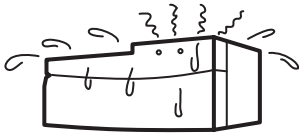
電源を
入れておく

装置を低温環境下でご使用になる場合、システム電源は常時入れておく

低温環境下で長時間システムの電源を落とした状態で放置すると、結露などにより故障の原因になります。
ランプなどの消耗品は OFF にしておくと、劣化を防ぐことができます。

電源を
入れない

装置を低温室から常温の場所に移動させる場合、常温に設置後、装置内の結露が無くなるまでシステム電源を入れない（状況により異なるが、通常半日から一昼夜）



感電・漏電火災の原因になります。

弊社製品についてのお問合せ　（バイオダイレクトライン）

TEL：03-5331-9336

受付時間 9：00 ～ 17：30
土・日・祝日、弊社指定休業日、年末年始を除く

www.gelifesciences.co.jp

e-mailで最新情報をお届けしています。お申込みは上記Webサイト右上の「メール会員登録」から。

©2009 GE ヘルスケア・ジャパン株式会社 本書の全部または一部を無断で複写複製することは、著作権法上の例外を除き、禁じられています。
掲載されている製品は試験研究用以外には使用しないでください。掲載されている内容は予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。
掲載されている社名や製品名は、各社の商標または登録商標です。

GEヘルスケア・ジャパン株式会社
ライフサイエンス統括本部
〒169-0073
東京都新宿区百人町 3-25-1 サンケンビルヂング
お問合せ：バイオダイレクトライン
TEL : 03-5331-9336　FAX : 03-5331-9370
e-mail : Tech-JP@ge.com

ISO 9001:2000認証取得

取扱店